

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



## **Toxicidade versus ação terapêutica de arsénio no cancro**

Bruno Miguel Gonçalves Soares

**Mestrado em Química**  
**Especialização em Química**

Dissertação orientada por:  
Pedro Luís Vieira Falé

2017



# Agradecimentos

Em primeiro, gostaria de agradecer ao Professor Pedro Falé por me ter aceite como orientando, pela orientação e transmissão de conhecimentos ao longo deste ano. Agradeço também toda a paciência e delicadeza que mostrou ter comigo durante as alturas de maior *stress*.

Um obrigado à Professora Maria Luísa Serralheiro por me ter proporcionado a possibilidade de realizar esta Tese de Mestrado e me ter permitido trabalhar no seu laboratório. Ao Centro de Química e Bioquímica pelo acolhimento e financiamento prestados ao longo deste ano letivo.

Agradeço também ao Professor Parvez Haris pela transferrina humana que facultou para ser possível a realização dos ensaios experimentais e pelo *input* que teve na formulação do meu tema de mestrado.

Obrigado às minhas colegas de Laboratório Asma Ressaissi, Joana Catarro, Rebeca Esperança, Laura Guedes, Joana Henriques e ao André Filipe por terem providenciado um bom local de trabalho e por todas a risadas e apoio que me prestaram quando precisei. À professora Rita Pacheco, um obrigado, pela ajuda e simpatia que providenciou sempre que necessário.

A todos os outros que se cruzaram no meu caminho e me moldaram para estar onde estou.

Agradeço também às minhas amigas Catarina Oliveira e Joana Araújo, as minhas cientistas favoritas, pela amizade demonstrada ao longo deste ano, motivação, incentivo, compreensão e companhia que demonstraram para comigo. Um GIGANTE obrigado por estarem sempre ao meu lado, sem vocês não teria conseguido.

Aos meus amigos Nídia Menino, Cecília Delgado, Margarida Pais, Renato Tomás, Diogo Ramalho e Sofia Valente com os quais criei uma relação mais profunda durante a minha estadia cá em Lisboa. Pelo apoio e paciência que tiveram a ouvir-me por todos os sorrisos e por me fazerem crescer e ser melhor!

À Sara Salgueria, Inês Romano, Teba Sousa, Daniela Ramos, Carolina e Inês Alves, Marta Jorge e Andreia Santos que estiveram comigo durante a minha fase ‘louca’ e por estarem sempre presentes mesmo que fisicamente ausentes. Pela motivação, momentos, apoio nas épocas de estudo, pela companhia e amizade que sempre demonstraram. No fundo por me apoiarem incondicionalmente!!!

Às ‘mais que tudo’ de Coimbra, a Gisela Bastos e a Andreia Costa que me acompanharam durante todo este percurso universitário. Por, na minha visão, ainda sermos os ‘três mosqueteiros’, termos tido um Atlântico de distância e a nossa amizade nunca ter esmorecido, por ouvirem os meus deambulares bioquímicos com tanta paciência e dedicação. OBRIGADO, do fundo do coração!

*Last but not least*, uma enorme SALVA DE PALMAS aos meus pais! À minha mãe por ser o meu apoio emocional e sempre me ouvir durante os momentos mais complicados. Ao meu pai por ser o meu apoio mais racional trazendo-me à razão sempre que a necessidade o exigia. À minha irmã pelo apoio e carinho caraterístico que só ela consegue providenciar. Sem vocês esta etapa nunca teria sido possível de ultrapassar. Acreditem, são os meus heróis!

A todos vocês,

OBRIGADO!!!



# Resumo

Este trabalho tem como objetivo estabelecer estratégias para modular a bioatividade do trióxido de arsénio (ATO) com base na sua ligação a proteínas plasmáticas. Este composto tem um elevado impacto na saúde humana, constituindo um problema para a saúde pública por contaminação de água e alimentação, mas também sendo usado para fins terapêuticos. Assim, pretende-se conhecer como o ATO interage com proteínas de transporte, assim como o efeito de ligandos fitoquímicos conhecidos sobre a toxicidade do mesmo.

A toxicidade do ATO foi avaliada em células HeLa por ensaios de MTT, sozinho e em combinações com albumina de soro bovino (BSA), transferrina, ácido rosmarínico (ligando da BSA) e ferro (ligando da transferrina). A estequiometria de ligação proteína-ATO foi quantificada para a BSA e transferrina, na ausência e presença de ligandos conhecidos, usando um método colorimétrico para deterctar arsénio livre, e efetuou-se um estudo de alterações conformacionais das proteínas por métodos espectrométricos. Por fim, quantificou-se RA (ácido rosmarínico) em extratos de plantas aromáticas por HPLC-DAD para saber se a quantidade de RA presente na alimentação poderá ser diretamente aplicada nos efeitos observados *in vitro*.

A toxicidade do ATO aumentou aproximadamente 10x na presença de BSA em concentração semelhante à da albumina no soro humano. No entanto, a presença de RA juntamente com BSA e ATO diminui a toxicidade do ATO aproximadamente 4x em relação a ATO sozinho e 40x em relação ao ATO com BSA. A presença de apo-transferrina (sem ferro) e a holo-transferrina (com ferro) em concentrações plasmáticas demonstraram uma diminuição do efeito tóxico do ATO.

O estudo da estequiometria de ligação de BSA ao ATO mostrou que após incubação com os fitoquímicos RA e quercetina ocorreu um aumento de afinidade de ATO à BSA. A BSA incubada com ácido láurico demonstrou uma diminuição da afinidade para o ATO. A Apo- e holo-transferrina mostraram semelhantes afinidade para ATO. A ligação de ATO a qualquer uma das proteínas em estudo não causou alterações da estrutura secundária das proteínas observáveis por espectrometria de UV-visível, fluorimetria ou espectroscopia de FT-IR, apesar de algumas alterações serem observáveis pela ligação de outros ligandos como o RA.

A quantidade de RA obtida após extração e digestão gastrointestinal de três plantas da família *Lamiaceae*, alecrim, tomilho e orégãos, indica que as quantidades de plantas utilizadas no quotidiano são bastante inferiores às necessárias para obter as condições dos ensaios de citotoxicidade com uma toma. No entanto, os resultados obtidos *in vitro* são bastante promissores pois tomas regulares às refeições podem manter as concentrações de fitoquímicos em circulação durante longos períodos de tempo.

Em conclusão, o efeito tóxico do ATO é acentuado na presença de BSA na concentração existente no plasma de seres humanos. A presença de BSA-RA, na mesma concentração, indica um efeito destoxicante na presença de RA. Este efeito poderá também estar associado ao número de moléculas de ATO que se associam à proteína na presença de RA. Estas evidências indicam que o RA poderá ser um composto com potencial para ser usado na modulação do efeito tóxico do ATO.

**Palavras – chave:** Trióxido de arsénio, Efeito biológico, Albumina, Transferrina, Ácido Rosmarínico, Plantas aromáticas.



# Abstract

The main purpose of this work is to establish strategies to modulate arsenic trioxide (ATO) bioactivity based on its interaction with plasma proteins. This compound has a major impact in human health, being a public health concern as a groundwater and food contaminant, but is also used in therapy. Therefore it is necessary to know how ATO interacts with plasma proteins such as the effect of known phytochemicals in ATO toxicity.

ATO toxicity was evaluated in HeLa cells by MTT assay, alone and in the presence of bovine serum albumin (BSA), transferrin, rosmarinic acid (BSA ligand) and iron (transferrin ligand). Binding stoichiometry of protein-ATO complexes was quantified for BSA and transferrin before and after incubation with known ligands through a colorimetric method to detect trivalent arsenic. Alterations in protein conformation were studied by spectrometric methods. Finally, rosmarinic acid (RA) was quantified in aromatic plant extracts by HPLC-DAD to know if the RA content in these plant material could be comparable to *in vitro* results.

ATO toxicity increased 10x times after cell incubation with plasmatic concentration of BSA. However, the presence of RA in the same amount of proteins caused a decrease in toxicity of approximately 4x the effect of ATO alone and 40x of the BSA-ATO assay. Apo- (without iron) and holo-transferrin (with iron) in plasma concentrations showed a decreased toxic effect.

The stoichiometry of BSA-ATO binding showed that after incubating with phytochemicals such as RA and quercetin the affinity to ATO increased. BSA incubated with lauric acid decreased its affinity to ATO. Apo- and holo-transferrin showed the same affinity to ATO. ATO binding to the proteins under study did not cause structure changes detectable by UV-visible, fluorimetry and FT-IR spectroscopy although some changes were observed after binding of RA.

The amount of RA was quantified after extraction and gastrointestinal digestion of 3 *Lamiaceae* species such as rosemary, thyme and oregano. The results indicate that the amount of the plants used in gastronomy are inferior to the amount needed for the effect observed *in vitro*. However, the *in vitro* results are promising as regular uptake of phytochemicals could influence their plasma concentration.

In conclusion, the toxic effect of ATO is increased by BSA at plasma concentration. The presence of RA complexed to BSA, in the same concentration, shows that RA could have a detoxifying effect. This effect could be related to the number of ATO molecules that associates with the proteins after RA binds to BSA. These evidences show that RA could be used in the modulation of ATO's toxicity.

**Keywords:** Arsenic Trioxide, Biological effect, Albumin, Transferrin, Rosmarinic Acid, Aromatic plants.





# Abreviaturas e Siglas

ATO – Trióxido de arsénio (do inglês *Arsenic Trioxide*);

A.C. – Antes de Cristo;

BSA-RA – Complexo formado entre BSA e RA;

D.C. - Depois de Cristo;

EPA – Agencia de Proteção Ambiental (do inglês *Environmental Protection Agency*)

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*);

HSA – Albumina sérica humana (do inglês *Human Serum Albumin*);

HPLC - DAD – Cromatografia Líquida de alta Performance com detetor da gama díodo (do inglês *High Performance Liquid Chromatography coupled DAD*);

DMSO – Dimetilsulfóxido;

FT-IR – Transformada de Fourier de Radiação Infra-vermelha (do inglês *Fourier Transform of Infrared Radiation*);

FBS – Soro Fetal Bovino (do inglês *Fetal Bovin Serum*);

GSH – Glutathiona reduzida;

HeLa – Células do adenocarcinoma cervical;

IC<sub>50</sub> – Concentração de composto que causa 50% de inibição num processo bioquímico;

LCV – Leucocristal violeta (4,4',4''-Metilidinetris (N,N-dimetillanilina));

LD<sub>50</sub> – Dose letal 50 – Concentração necessária para causar morte a 50% dos indivíduos expostos a um composto (do inglês *Lethal dose 50*);

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda;

RPMI 1640 – Meio de cultura RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*);

pK<sub>a</sub> – Contante de dissociação de acidez;

PBS – Tampão de fosfatos salino (do inglês *Phosphate Saline Buffer*);

Pen-Strep – antibiótico penicilina-estreptomicina (do inglês *Penincilin-Streptomicyn*);

MeOH – Metanol;

MTT – Brometo de (3-(4,5-Dimethiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio);

OMS – Organização Mundial de Saúde;

RA – Ácido Rosmarínico [(2"R")-2-[(2"E")-3-(3,4-Dihidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]]oxi]-3-(3,4-dihidroxifenil) ácido propanoico] (do inglês *rosmarinic acid*);

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Specie*);

SOD – Superóxido dismutase;

Tampão K-Fosfatos – Tampão fosfatos 50 mM, pH 7,4 com 100 mM de NaCl;

USGS – Serviço Geológico dos Estados Unidos (do inglês *United States Geological Survey*).

# Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Contextualização Histórica.....	3
1.2	Físico-química.....	4
1.3	Arsénio como preocupação Mundial.....	7
1.4	Toxicidade e destoxificação de arsénio inorgânico em seres humanos.....	8
1.5	Proteínas de Transporte.....	9
1.5.1	Albumina Sérica.....	10
1.5.2	Transferrina.....	11
1.6	Alimentação Mediterrânica e Ácido Rosmarínico.....	11
2.	Objetivos.....	13
3.	Procedimento Experimental.....	17
3.1	Materiais.....	19
3.1.1	Reagentes.....	19
3.2	Métodos.....	19
3.2.1	Preparação de Soluções.....	19
3.2.2	Manutenção de Linhas Celulares e Ensaios de Citotoxicidade.....	19
3.2.3	Determinação da Estequiometria da Ligação Proteína-ATO.....	20
3.2.3.1	Separação Arsénio-livre vs Arsénio Proteína.....	21
3.2.3.2	Tratamento de Resultados.....	22
3.3	Análise estrutural de Proteínas.....	22
3.3.1	Uv-Visível.....	22
3.3.2	Fluorescência.....	23
3.3.3	FT-IR.....	23
3.3.4	Quantificação Protéica.....	24
3.4	Preparação de Extratos em plantas aromáticas.....	24
3.4.1	Preparação de decocções.....	24
3.4.2	Quantificação de Ácido Rosmarínico em extratos aquosos.....	24
3.4.3	Digestão Gastrointestinal <i>In Vitro</i> .....	25
3.4.3.1	Digestão Gástrica.....	25
3.4.3.2	Digestão Intestinal.....	25
4.	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Ação Biológica ATO em células HeLa.....	29
4.1.1	Citotoxicidade do ATO na presença de BSA.....	29
4.1.2	Citotoxicidade do ATO na presença de apo/olo-transferrina.....	30
4.2	Quantificação da Estequiometria da Ligação Proteína – ATO.....	33
4.2.1	Quantificação da Ligação BSA – ATO.....	33
4.2.2	Quantificação da Ligação Apo/Holo-transferrina– ATO.....	34
4.3	Análise Estrutural de Proteínas.....	36
4.3.1	BSA.....	36
4.3.1.1	Absorção no UV-visível.....	36
4.3.1.2	Quantificação Protéica.....	37
4.3.1.3	Fluorescência.....	38
4.3.1.4	FT-IR.....	40
4.3.2	Transferrina.....	44

4.3.2.1	Absorção no UV-visível .....	44
4.3.2.2	Quantificação Protéica.....	47
4.3.2.3	Fluorescência.....	47
4.3.2.4	FT-IR .....	48
4.4	Quantificação de ácido rosmarínico em plantas da família <i>Lamiaceae</i> .....	52
4.4.1	Quantificação em extratos aquosos .....	52
4.4.2	Digestão Gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	54
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras .....	57
6.	Referências Bibliográficas .....	61
7.	Anexos.....	i

# Índice de Figuras

Figura 1.1 - Arsénio na sua forma elementar ( $\text{As}^0$ ) ( <a href="https://forum.nationstates.net/viewtopic.php?t=100892&amp;p=5018501">https://forum.nationstates.net/viewtopic.php?t=100892&amp;p=5018501</a> ).....	4
Figura 1.2 - Estruturas do gás arsino (A), arsenite (B) e arsenato (C), correspondentes aos estados de oxidação do $\text{As}^{-3}$ , $\text{As}^{+3}$ e $\text{As}^{+5}$ , respetivamente.....	5
Figura 1.3 Várias formas metiladas de arsénio nos estados de oxidação III e V. ....	5
Figura 1.4 – Estrutura de arsenocolina (A) arsenobetaína (B) e organolípidos (C). ....	6
Figura 1.5 Organização estrutural do ião $\text{As}^{3+}$ , originando uma estrutura cúbica $\text{As}_4\text{O}_6$ (A) e uma estrutura monoclinica $\text{As}_2\text{O}_3$ (B). Representações adaptadas da literatura <sup>25</sup> .....	6
Figura 1.6 Estatística anual de 2012 da USGS (United States Geological Survey) de produção de ATO a nível Mundial.....	7
Figura 1.7 Reação entre o ATO e metalotioneínas.....	9
Figura 1.8 Reações envolvidas na destoxificação de espécies de arsénio <sup>III</sup> em organismos. Inicialmente uma arseno-redutase reduz o $\text{As}^V$ a $\text{As}^{III}$ que é posteriormente metilado a $\text{MMAs}^V$ , contudo o arsénio pode ser continuamente reduzido e metilado até se obter trimetilarsino, que é excretado na urina. ....	9
Figura 1.9 Espécies da família Lamiaceae: Rosmarinis officinalis (A); Thymus vulgaris (B); Origanum vulgare (C).....	12
Figura 1.10 Estrutura do ácido cafeico (A), retirado de: <a href="http://www.fcencias.com/2013/03/14/molecula-da-semana-acido-cafeico/">http://www.fcencias.com/2013/03/14/molecula-da-semana-acido-cafeico/</a> ) ácido rosmarínico (B) adaptado de <sup>62</sup> .....	12
Figura 3.1 – Esquema de centrifugação para separação do arsénio livre do arsénio (roxo) ligado ao complexo proteína-ATO (laranja). ....	22
Figura 4.1 Perfil de citotoxicidade obtido pelo ensaio de MTT do composto ATO sobre a linha celular HeLa Kyoto, incubada com 40,00 mg/mL (601,50 $\mu\text{M}$ ) de BSA e BSA-RA, sobre concentrações crescentes de ATO. As concentrações de ATO estudadas (0 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 15 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$ ) encontram-se apresentadas com os respetivos desvios padrão associados com os desvios padrão associados (8 $\times$ 2 replicados).....	29
Figura 4.2 Perfil de citotoxicidade obtido pelo ensaio de MTT do composto ATO sobre a linha celular HeLa Kyoto, incubada com 2,60 mg/mL (33,77 $\mu\text{M}$ ) de apo- e holo-transferrina, sobre concentrações crescentes de ATO. As concentrações de ATO estudadas (0 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 15 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$ ) encontram-se apresentadas com os desvios padrão associados (8 $\times$ 2 replicados).....	31
Figura 4.3 Espetros de Uv-Visível de 0,40 mg/mL (6,02 $\mu\text{M}$ ) de BSA com concentrações crescentes de ATO.....	37
Figura 4.4 Absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de UV-Visível de 0,40 mg/mL (6,02 $\mu\text{M}$ ) de BSA com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).....	37
Figura 4.5 Espectro de emissão de fluorescência da BSA na concentração de 0,40 mg/mL (6,02 $\mu\text{M}$ ) na presença de 167,67 e 333,3 $\mu\text{M}$ de ATO.....	39
Figura 4.6 Espetros de FT-IR da BSA na concentração de 32,00 mg/mL (481,20 $\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	41
Figura 4.7 Razões de absorvência entre os números de onda 1635/1652 $\text{cm}^{-1}$ obtidas pelos valores dos números de onda da segunda derivada. ....	41
Figura 4.8 Espetros de FT-IR da BSA-RA na concentração de 32,00 mg/mL (481,20 $\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	42
Figura 4.9 Espetros de FT-IR da BSA-RA na concentração de 32,00 mg/mL (481,20 $\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	43
Figura 4.10 Espetros de Uv-visível da apo-transferrina na concentração de 0,40 mg/mL (5,20 $\mu\text{M}$ ), incubados com de 100 $\mu\text{M}$ de $\text{Fe}^{+3}$ (A) e de 100 $\mu\text{M}$ de ATO (B). ....	44

Figura 4.11 Espectros da apo-transferrina na concentração de 0,40mg/mL (5,20µM) incubada com concentrações crescentes de ATO.....	45
Figura 4.12 Valores de absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de UV-Visível de 0,40 mg/mL (5,20µM) de apo-transferrina com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).....	45
Figura 4.13 Espectros da holo-transferrina, na concentração de 0,40 mg/mL (5,20 µM) após a adição de concentrações crescentes de ATO.....	46
Figura 4.14 Absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de Uv-Visível de 0,40 mg/mL (5,20 µM) de holo-transferrina com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados). ....	46
Figura 4.15 Espectros de fluorescência (emissão) obtidos com o comprimento de onda de excitação de 280 nm, para a transferrina na presença das concentrações indicadas de ATO e Fe <sup>+3</sup> .....	48
Figura 4.16 Espectros de FT-IR apo-transferrina (Apo-T.) na concentração de 32,00 mg/mL (415,58 µM), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	49
Figura 4.17 Razão entre folhas β/ hélices α referentes à apo-transferrina (Apo-T.) e da holo-transferrina (Holo-T.) obtidas pelos valores dos números de onda da segunda derivada.....	50
Figura 4.18 Espectros de FT-IR Apo-transferrina (Apo-T.) e da holo-transferrina (Holo-T.) na concentração de 32,00mg/mL (415,58µM), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	50
Figura 4.19 Espectros de FT-IR da Holo-transferrina (Holo-T.) na concentração de 32,00 mg/mL (415,58µM), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I. ....	51
Figura 4.20 Espectro do ácido rosmarinico.....	52
Figura 4.21 Cromatogramas de Rosmarinus Officinalis, Thymus vulgaris e Origanum vulgare, obtidos em total-range (200-600 nm) para 1,00mg/mL de extrato vegetal aquoso. ....	53
Figura 4.22 Reta de calibração obtida pelas áreas dos picos referentes ao ácido rosmarínico, a 330 nm obtidos entre as concentrações de 10,00 e 100,00 µM. ....	53
Figura 4.23 Reta de calibração obtida pelas áreas dos picos referentes ao ácido rosmarínico, a 330nm obtidos entre as concentrações de 10,00 e 100,00 µM. ....	53

# Índice de Tabelas

Tabela 3.1 Números de onda, médias e desvios em D <sub>2</sub> O, dos motivos de estrutura secundária de proteínas <sup>74</sup> .....	24
Tabela 4.1 Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos desvios padrão, obtidos no ensaio de MTT para as células HeLa após incubação com BSA na concentração de 40,00 mg/mL (601,50µM) com os desvios padrão associados (8×2 replicados).....	30
Tabela 4.2 Valores de IC <sub>50</sub> e respectivos desvios padrão obtidos no ensaio de MTT para as células HeLa após incubação com apo- e holo-transferrina na concentração de 2,60 mg/mL (33,77µM) com os desvios padrão associados (8×2 replicados).....	32
Tabela 4.3 Valores obtidos da estequiometria da ligação BSA-ATO com os respectivos desvios padrão (3 replicados).....	33
Tabela 4.4 Estequiometria apo/holo-transferrina-ATO com os respectivos desvios padrão (3 replicados). .....	35
Tabela 4.5 Quantificação de BSA em solução pelo método de Bradford com os desvios padrão associados (3 replicados )......	38
Tabela 4.6 Resultados do Método de Bradford para a transferrina na presença de concentrações de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).....	47
Tabela 4.7 Concentrações de RA obtidas através da reta representada na Figura 4.22 assim como as concentrações em mg RA/mL obtidos a partir das concentrações em µM e a % de RA/mg de extrato. .....	53
Tabela 4.8 Rendimentos e quantidade de RA total obtido em cada uma das extrações.....	54
Tabela 4.9 Tabela representativa dos resultados obtidos para a digestão gástrica e intestinal. A concentração disponível para absorção por mg RA/ mg de extrato foi obtida por relação direta entre a quantidade de RA por mg de extrato e as percentagens obtidas em cada uma das digestões com os desvios padrão associados (3 replicados).....	55





# Índice de Anexos

Anexo 7.1 Coeficientes das retas uniparamétricas usadas na calibração, obtidas por regressão linear, assim como o valor do quadrado do coeficiente de correlação entre valores. ....	iii
Anexo 7.2 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) de BSA (0,40 mg/mL) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respetivamente no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abcissas X).....	iii
Anexo 7.3 - Espectro de absorção (A) e de emissão (B) do ATO (100,00 µM) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respetivamente, no eixo das ordenadas Y) em função.....	iii
Anexo 7.4 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) do Fe <sup>3+</sup> (100,00 µM) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respetivamente, no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abcissas X).....	iv
Anexo 7.5 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) da apo-transferrina (0,40 mg/mL) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respetivamente, no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abcissas X). ....	iv
Anexo 7.6 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, in vitro, de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de <i>Rosmarinus Officialis</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática .....	v
Anexo 7.7 Cromatogramas obtidos após a Digestão Gástrica e Intestinal de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de <i>Rosmarinus Officialis</i> após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática.....	v
Anexo 7.8 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, in vitro, de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de <i>Thymus vulgaris</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática .....	vi
Anexo 7.9 Cromatogramas obtidos após a Digestão Gástrica e Intestinal de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de <i>Thymus Vulgaris</i> após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática .....	vi
Anexo 7.10 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, in vitro, de 1,00 m/mL de extrato aquoso obtido de <i>Origanum vulgare</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática .....	vii
Anexo 7.11 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, in vitro, de 1,00m/mL de extrato aquoso obtido de <i>Origanum vulgare</i> . C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática. ....	vii



‘Todas as substâncias são venenos, não há nenhuma que não o seja.  
A dose certa é que diferencia um veneno de um remédio’

*Paracelsus (1493-1541)*



# **1. Introdução**



## 1.1 Contextualização Histórica

Os primeiros registros da toxicidade de compostos com arsênio no ocidente remontam ao ano de 370 A.C., quando Hipócrates observou que mineiros sentiam dores abdominais após a inalação ou ingestão de um ‘pó branco’. Mais tarde descobriu-se que esse ‘pó’ era trióxido de arsênio (ATO,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ), um subproduto da extração mineira<sup>1,2</sup>. Da mesma forma, outros médicos ao longo da história descreveram os sintomas da mesma intoxicação em mineiros, atualmente associados à arsenicose, que se queixavam de náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia, sintomas típicos da intoxicação aguda por arsênio. Contudo, estes sintomas nunca foram associados diretamente à intoxicação com arsênio<sup>3</sup>. Apesar destas evidências, o seu potencial como fármaco também se encontra discriminado nos escritos de Hipócrates que usou uma ‘pasta de arsênio’ para o tratamento de úlceras e abscessos<sup>4</sup>. A primeira classificação do arsênio como veneno foi descrita por Pendanius Dioscorides, autor da farmacopeia *De Materia Medica*, descrevendo a sua utilização por Nero, em 55 A.C., como agente homicida<sup>5</sup>.

A medicina Ayurvédica<sup>6</sup>, praticada na Índia há milhares de anos, também apresenta registros da utilização de extrações herbais que continham arsênio. Também na China foi usado como agente terapêutico, de acordo com escritos datados de 263 A.C.<sup>2,6</sup>

Conhecido como ‘veneno dos reis’, o arsênio foi utilizado ao longo de centenas de anos, adotando um papel ambíguo em diferentes civilizações. A capacidade de ser utilizado como fármaco ou como agente homicida, como cosmético ou pigmento em roupas e outros objetos do cotidiano fez com que este metaloide ganhasse relevância ao longo da história<sup>7</sup>.

Na Europa, tanto na idade Média como no Renascimento, o arsênio foi preferido como veneno comum especialmente usado por estratos superiores da sociedade por ser capaz de induzir envenenamento de forma discreta. A capacidade do ATO de passar despercebido quando inalado ou ingerido (por não possuir sabor nem cheiro) e os seus efeitos extremamente tóxicos, fazem do arsênio um ‘veneno’ de eleição nas classes sociais mais favorecidas<sup>8</sup>.

Por falta de metodologias analíticas para detecção de arsênio, as suspeitas de envenenamento que ocorreram ao longo da história não puderam ser comprovadas. Contudo, em 1840, John Marsh, criou a primeira metodologia analítica para detecção de arsênio com o intuito de provar o envolvimento de Marie LaPen no assassinato do seu marido<sup>7</sup>. Assim, foi criada a primeira metodologia analítica para detecção de arsênio, o ‘teste de Marsh’. Este consiste numa reação de oxidação-redução com zinco e ATO em meio ácido, na qual o zinco sofre oxidação e o arsênio é reduzido e posteriormente convertido em gás arsino ( $\text{AsH}_3$ ) na presença de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). O gás de arsênio possui um odor desagradável, permitindo a identificação de ATO em amostras<sup>9</sup>.

A utilização de arsênio como pigmento em tintas e objetos do cotidiano encontra-se também documentada. O pigmento ‘Green Paris’ (acetoarsenite de cobre –  $3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2 \cdot \text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ) empregue na coloração de brinquedos, tinta de parede e muitos outros objetos, encontra-se associado a uma série de mortes que ocorreram no início do século XIX, levando à descontinuação da utilização do pigmento. Posteriormente, na primeira metade do século XIX, o ‘Green Paris’ foi permitido como pesticida, sendo depois substituído pelo arsenato de chumbo ( $\text{PbHAsO}_4$ ), que surtia menor toxicidade para as colheitas<sup>10</sup>. Este composto foi também associado a problemas de saúde em agricultores, o que levou à proibição da sua comercialização em 1988, nos EUA<sup>7,11</sup>. Estes herbicidas foram então substituídos por compostos organoarsénicos como o monossódio metaarsonato ( $\text{MSMA}^{\text{V}}$ ) e o ácido dimetilarsínico ( $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ). O arsênio orgânico no estado de oxidação  $\text{As}^{\text{V}}$  não é incorporado pelas células tão rapidamente como o arsênio<sup>III</sup>, o que reduz muito a sua toxicidade<sup>12</sup>. Em 2007<sup>13</sup> a EPA, nos Estados Unidos, considerou o  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  como carcinogénico para humanos, sendo retirado do mercado em 2009<sup>14</sup>. Relativamente ao  $\text{MSMA}^{\text{V}}$ , foi limitado ao uso como herbicida em plantações de algodão<sup>4</sup>.

Em 1786, iniciou-se a utilização da solução de Fowler, que continha 1% de arsenato de potássio ( $\text{KH}_2\text{AsO}_4$ ), para tratar doenças como malária, sífilis, asma, eczema e psoríase<sup>4,7,6</sup>. Observou-se durante

estes anos de utilização que esta solução tinha capacidade de diminuir a contagem de glóbulos brancos em pacientes com leucemia. Anos mais tarde, em 1910, Paul Elrich introduziu o Salvarstan, conhecido como ‘bala mágica’. Este composto, baseado na ação biológica do arsénio, substituiu a solução de Fowler que, apesar da sua eficiência, possuía uma toxicidade demasiado elevada. O Salvarstan foi utilizado até 1940 para o tratamento de várias infeções bacterianas até ao aparecimento da penicilina em 1940<sup>4,7</sup>. Apesar da eficiência da solução de Fowler na diminuição da contagem de glóbulos brancos em pacientes com LPA (*Leucemia Promielocítica Aguda*), esta foi perdendo relevância, sendo substituída por uma solução de ATO, ainda hoje utilizada no tratamento da LPA como agente anti-cancerígeno. Atualmente, comercializa-se o fármaco Trisenox<sup>15</sup>, aprovado pela União Europeia em 2002<sup>16</sup>, para tratamento da LPA, administrado na concentração de 0,15 mg/kg em conjunto com ácido all-trans retinóico. O tratamento baseado em ATO mostrou ser eficaz na remissão da leucemia sem necessidade de terapia combinada<sup>14</sup>. A eficiência deste fármaco contra esta doença em particular, tem suscitado o interesse da comunidade científica levando ao estudo do seu efeito noutras linhas celulares e provando ser eficaz na eliminação de células cancerígenas da próstata e do ovário<sup>17</sup>, do cólon<sup>18</sup>, em várias linhas celulares do cancro do pulmão, no adenocarcinoma cervical e no cancro da mama<sup>19</sup> assim como em gliomas<sup>20</sup> e no cancro gástrico<sup>21</sup>, *in vitro*.

## 1.2 Físico-química

O arsénio é um elemento quimicamente classificado como metaloide. Possui propriedades metálicas e não metálicas e encontra-se largamente disperso pela crosta terrestre. O arsénio elementar ( $\text{As}^0$ ) afigura-se sólido, de coloração cinzenta brilhante (Figura 1.1) e escura em condições atmosféricas<sup>22</sup>. Contudo, a sua capacidade de se combinar com muitos outros elementos, adotando vários estados de oxidação, permite que esteja presente em mais de 245 minerais<sup>23</sup>. A sua abundância natural na crosta terrestre é de cerca de 6 ppm variando a sua concentração consoante a região geográfica do planeta<sup>24</sup>. O arsénio é um elemento bastante elusivo adotando características como cor, reatividade e toxicidade diferentes consoante os elementos a que se encontra associado e o seu estado de oxidação. Por exemplo, o composto denominado realgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) possui uma cor avermelhada, já o orpimento ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) possui uma cor amarela clara. Adicionalmente, o composto em estudo, o ATO ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), afigura-se como um pó branco, inodoro e insípido.



Figura 1.1 - Arsénio na sua forma elementar ( $\text{As}^0$ ) (<https://forum.nationstates.net/viewtopic.php?t=100892&p=5018501>).

A variedade de ligações químicas que o arsénio pode estabelecer encontra-se associada à sua estrutura eletrónica que possibilita também a conjugação do mesmo com vários elementos e consequente formação de espécies sólidas, líquidas e gasosas<sup>4,7 23–25</sup>.

Na Tabela Periódica o arsénio encontra-se no grupo V, no 4º período, abaixo do azoto (N) e do fósforo (P) e, tal como estes, possui uma deficiência de eletrões e orbitais não preenchidas confirmada pela distribuição eletrónica  $[\text{As}] 3d^{10} 4s^2 4p_x^1 4p_y^1 4p_z^1$  da sua forma elementar. Desta forma, o número de oxidação do arsénio pode variar entre  $\text{As}^{-3}$  (arsino),  $\text{As}^0$  (arsénio),  $\text{As}^{+3}$  (arsenite ou ácido arsenioso) e  $\text{As}^{+5}$  (arsenato ou ácido arsénico)<sup>25,26</sup>, estando a fórmula geral destes apresentada na Figura 1.2.



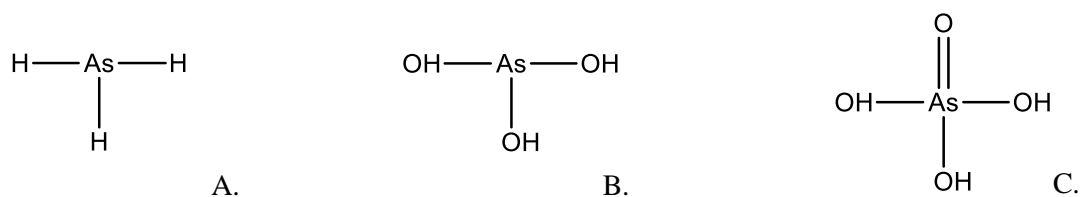


Figura 1.2 - Estruturas do gás arsino (A), arsenite (B) e arsenato (C), correspondentes aos estados de oxidação do  $\text{As}^{-3}$ ,  $\text{As}^{+3}$  e  $\text{As}^{+5}$ , respetivamente.  
Adaptadas da literatura <sup>25</sup>

Apesar deste elemento poder estar associado a um número muito variado de ligandos, ocorrendo num grande número de minerais, encontra-se mais comumente ligado covalentemente a enxofre (S) e a oxigénios (O), em compostos inorgânicos. Na Natureza podem ser detetadas formas de arsénio inorgânicas e orgânicas, sendo que a formação destas últimas se deve maioritariamente a mecanismos de destoxificação de organismos vivos<sup>23,25,27</sup>. A Figura 1.3 representa algumas das formas orgânicas metiladas sob a qual o arsénio pode ser encontrado.

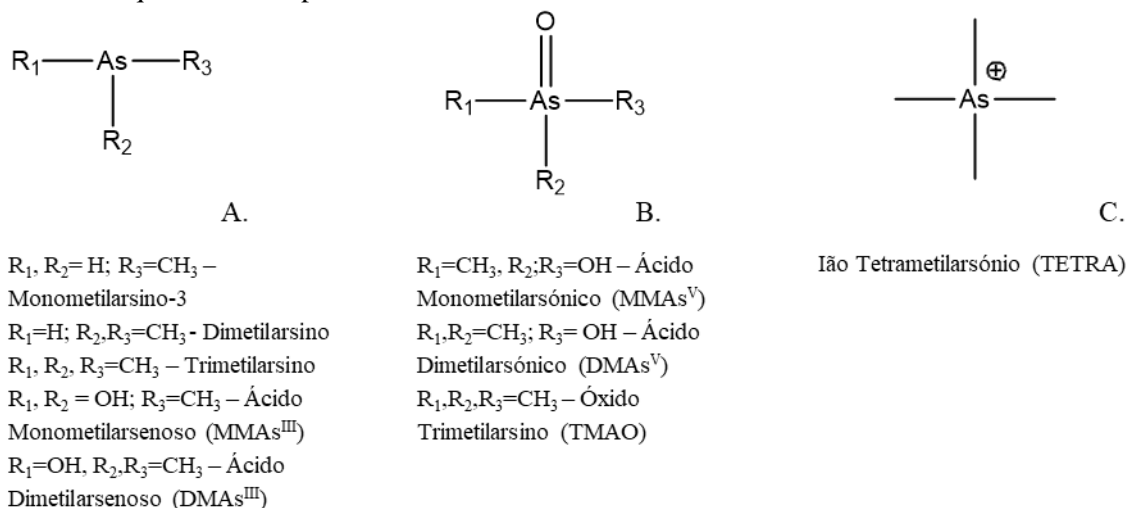


Figura 1.3 Várias formas metiladas de arsénio nos estados de oxidação III e V.  
Adaptadas da literatura <sup>25</sup>

O arsénio também pode ser encontrado como substituinte do fosfato em lípidos e como substituinte do azoto em compostos orgânicos. A Figura 1.4 representa as formas organoarsénicas de três compostos exemplo que resultam da substituição dos seus átomos ‘naturais’ por formas de arsénio.

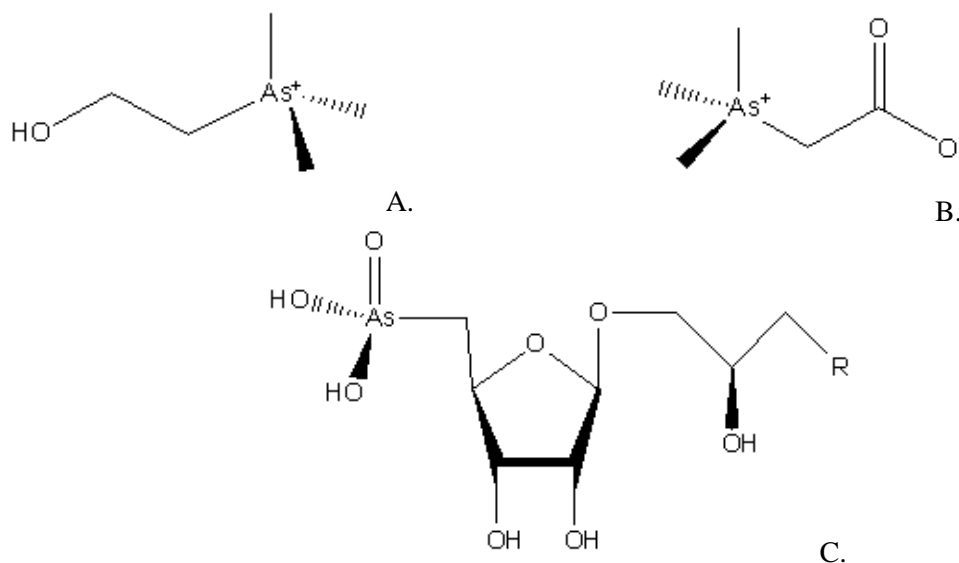


Figura 1.4 – Estrutura de arsenocolina (A) arsenobetaina (B) e organolípidos (C). Representações adaptadas da literatura <sup>25</sup>

A colina (N,N,N-trimetiletanoamonio), é um composto que se pode encontrar em sistemas biológicos desempenhando um papel essencial, podendo adotar uma função de neurotransmissor ou estar associado ao metabolismo lipídico<sup>28</sup>. A Figura 1.4 (A) representa a arsenocolina, obtida por substituição do Azoto por Arsénio. A betaína (N,N,N-trimetilglicina) é também um composto orgânico presente em sistemas biológicos, não essencial, que possui um papel essencial no metabolismo de lípidos<sup>29</sup>. Na Figura 1.4 (B), encontra-se representada a arsenobetaina, que também resulta da substituição do Azoto por Arsénio. Ainda na Figura 1.4 (C), encontra-se representada a estrutura de um arsenolípido, obtido por substituição do átomo de fósforo pelo arsénio. Estes compostos bio-inorgânicos resultam maioritariamente do metabolismo do arsénio inorgânico por seres marinhos<sup>30</sup>.

O número de estados de oxidação e consequente estrutura tridimensional que o arsénio pode adotar, permitem que este seja encontrado num grande número de compostos quer sejam orgânicos ou inorgânicos. Por exemplo, o As<sup>+3</sup> pode ser encontrado na forma mineral como arsenolite (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) ou claudetite (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) resultantes da organização estrutural distinta de moléculas de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>25</sup>, como representado na Figura 1.5.

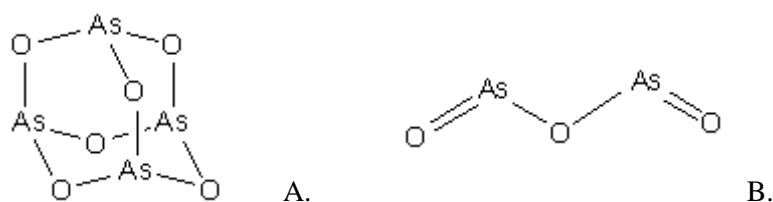
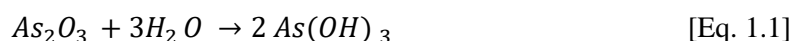
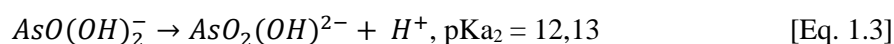


Figura 1.5 Organização estrutural do ião As<sup>3+</sup>, originando uma estrutura cúbica As<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (A) e uma estrutura monoclinica As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (B). Representações adaptadas da literatura <sup>25</sup>

Em solução aquosa, o ATO dissocia-se formando ácido arsenioso, como se pode observar na Equação 1.1. Como indicam os valores de pK<sub>a</sub> obtidos na literatura, descritos nas Equações 1.2, 1.3 e 1.4, o ATO é um ácido fraco e encontra-se na sua forma protonada (As(OH)<sub>3</sub>) a pH fisiológico.





### 1.3 Arsénio como preocupação Mundial

A OMS (Organização Mundial de Saúde) classifica o arsénio como carcinogénico Tipo I, ou seja, existem evidências de que este elemento é carcinogénico para seres humanos<sup>31</sup>. Assim, a Organização Mundial de Saúde tem trabalhado de forma a reduzir a exposição ao arsénio definindo valores orientadores e recomendando medidas de prevenção de risco. Para tal é aconselhado um limite de 10µg/L em águas para consumo humano<sup>32</sup>.

A atividade natural do planeta contribui para as emissões atmosféricas de arsénio sendo libertadas cerca de 7900 toneladas/ano de composto de arsénio, em explosões vulcânicas. As fontes antropogénicas que contribuem para a emissão de arsénio para a atmosfera englobam as atividades mineiras de extração de chumbo, cobre e ouro, a queima de combustíveis fósseis e o uso de pesticidas. Estima-se uma libertação para a atmosfera de 23 600 toneladas/ano, valores que têm vindo a diminuir desde 1940, ano no qual as emissões rondavam as 70 000 toneladas/ano<sup>30</sup>.

Atualmente os derivados orgânicos do arsénio são usados como pesticidas e herbicidas, consoante a legislação e as restrições de cada país. Outros compostos de arsénio como antifúngico para tratamento de madeira<sup>22</sup>, na indústria farmacêutica e de vidro, como preservantes para a indústria de peles, como semicondutores em dispositivos eletrónicos e complexos orgânicos ou ainda como estimulantes para crescimento de gado<sup>30</sup>. Atualmente, a produção anual de ATO limita-se aos países que se encontram discriminados na Figura 1.6, sendo a China o maior produtor a nível mundial de acordo com estatísticas realizadas em 2012<sup>33</sup>. Sendo ainda produzido como subproduto da exploração mineira com exceção da China que é o único país em que ainda existem minas para extração do composto<sup>12</sup>.

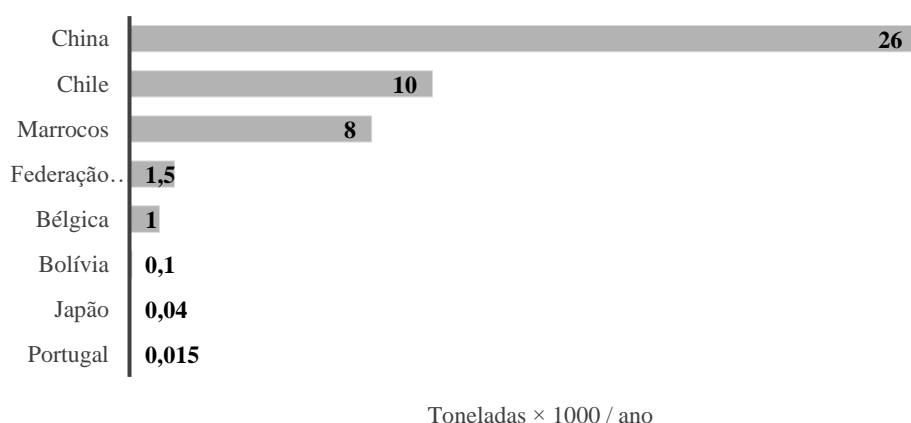


Figura 1.6 Estatística anual de 2012 da USGS (United States Geological Survey) de produção de ATO a nível Mundial.

No que ao arsénio diz respeito, a maior preocupação a nível mundial prende-se com a dissolução dos seus derivados inorgânicos em águas subterrâneas expondo sistemas biológicos à sua toxicidade.

Dados estatísticos indicam que a população de 107 países<sup>34</sup> distribuídos por todos os continentes se encontra exposta a formas de arsénio orgânico ou inorgânico por ingestão de águas contaminadas.

Contudo esta situação torna-se mais grave para a população de países asiáticos, como o Bangladesh e a Índia, estimando-se que 120 milhões de habitantes possuam sintomas de arsenicose<sup>24</sup>. A falta de tecnologia acessível economicamente, a ineficácia dos métodos de remoção do arsénio e as próprias condições geomórficas, conduziram ao estabelecimento de limites legais nestes países para valores de 50 µg/L, superiores aos recomendados pela OMS<sup>35</sup>. Porém tais valores são ainda muito superiores aos recomendados pela OMS que aconselha um máximo de 10 µg/L<sup>32</sup> em águas de consumo humano.

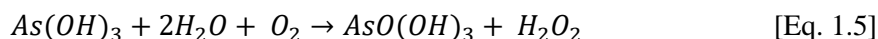
Mais precisamente no Bangladesh, a recorrência a ‘furos’ para a obtenção de água potável de aquíferos subterrâneos, por terem um elevado teor de espécies de arsénio, é a principal causa de intoxicação da população. Em adição, a utilização de água contaminada para irrigação de culturas de arroz (base da alimentação nestes países) aumenta a acumulação de arsénio nos solos e a sua passagem para a cadeia alimentar.

#### 1.4 Toxicidade e destoxificação de arsénio inorgânico em seres humanos

Como anteriormente referido, o arsénio pode encontrar-se nos vários estados físicos, variando consoante os elementos a que se encontra associado, o seu estado de oxidação e o pH a que se encontra. Da mesma forma, a toxicidade do metalóide varia consoante o composto em que se insere. O gás arsino ( $\text{AsH}_3$ ) é a sua forma mais tóxica, sendo necessária uma quantidade de 250 mg/m<sup>3</sup> e um tempo de exposição de 30 minutos para conduzir à morte por hemólise<sup>36</sup>. Seguidamente encontra-se o ATO com uma LD<sub>50</sub> de 34,5 mg/kg em adultos. Como anteriormente referido, as formas orgânicas apresentam menor toxicidade devido à sua solubilidade e consequente excreção mais rápida, com o LD<sub>50</sub> de cerca de 1800, 1200 e 8000 mg/kg para o ácido monometilarsónico (MMAs<sup>V</sup>), dimetilarsínico (DMAs<sup>V</sup>) e trimetilarsínico (TMAs<sup>III</sup>), respectivamente. Contudo, as formas mono- e di-metiladas de arsénio<sup>III</sup> representam uma exceção, podendo ser tão ou mais tóxicas como as formas inorgânicas trivalentes.

Após a absorção, o arsénio trivalente é facilmente incorporado em sistemas biológicos, quando comparado com formas pentavalentes. Contudo, no interior da célula ambos têm capacidade de interferir com a cadeia respiratória mitocondrial. O transporte para o meio intracelular de As<sup>III</sup> é realizado por aquaporinas enquanto que as formas de As<sup>V</sup> são incorporadas por transportadores de fosfato<sup>37</sup>.

Existem evidências de que o arsénio<sup>III</sup> atua de forma tóxica por geração de ROS (*Espécies reativas de oxigénio*). Uma das hipóteses para a formação de ROS, como demonstrado pela Equação 1.5. Em condições celulares o ATO é reduzido a arsénio pentavalente com formação de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )



O peróxido de hidrogénio participa na reação de Fenton na presença de  $\text{Fe}^{+2/+3}$ , produzindo ROS no meio intracelular, responsáveis pelo dano em cadeias de DNA e aumento da peroxidação lipídica, por exemplo, conduzindo à necrose ou apoptose ou induzindo mutações que poderão gerar massas tumorais. O aumento da atividade de enzimas redox como a SOD (*superóxido dismutase*) e a catalase, observado em células expostas ao ATO, suporta que o principal mecanismo de toxicidade seja por formação de ROS<sup>38</sup>. Por outro lado a presença de espécies de arsénio<sup>III</sup> em células diminui a presença de GSH (*glutathione reduzida*), por reação desta proteína com arsénio<sup>39</sup>, o que está também associado ao dano oxidativo. As espécies de As<sup>III</sup> apresentam grande afinidade para com grupos sulfidrílo, podendo estabelecer ligações covalentes com os enxofres destas proteínas, como se pode observar pelo esquema na Figura 1.7<sup>40</sup>.

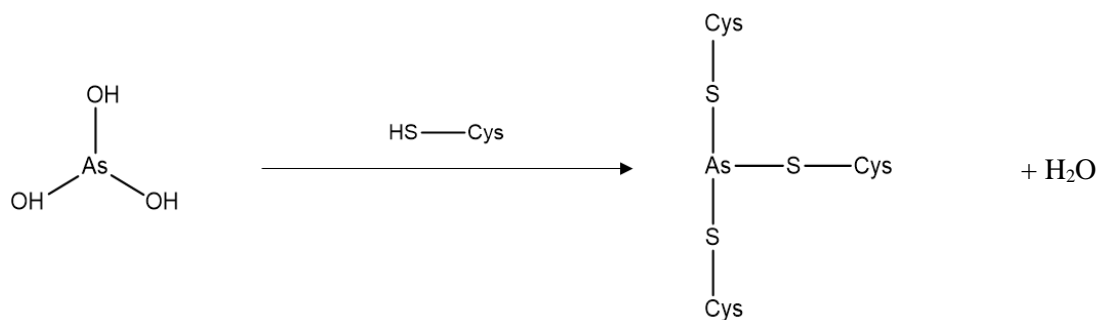


Figura 1.7 Reação entre o ATO e metalotioneínas.

No interior da célula o arsénio trivalente pode ainda inibir estruturas enzimáticas por ligação a grupos sulfidrilo, o que leva a crer que, em parte, a sua toxicidade seja exercida também por inibição das mesmas.

Atualmente, a biometilação do arsénio, com mobilização de enzimas como arseno redutases e metiltransferases para a formação de compostos organoarsénicos, como se pode observar no esquema representado pela Figura 1.8, é a principal via metabólica de destoxificação. NA Figura 1.8 observa-se que a forma pentavalente é reduzida por uma forma trivalente, por arsenoreductases. Posteriormente uma metiltransferase específica<sup>41</sup> transfere um grupo metilo para a forma trivalente, observando-se a oxidação de  $\text{As}^{\text{III}}$  para  $\text{As}^{\text{V}}$ .

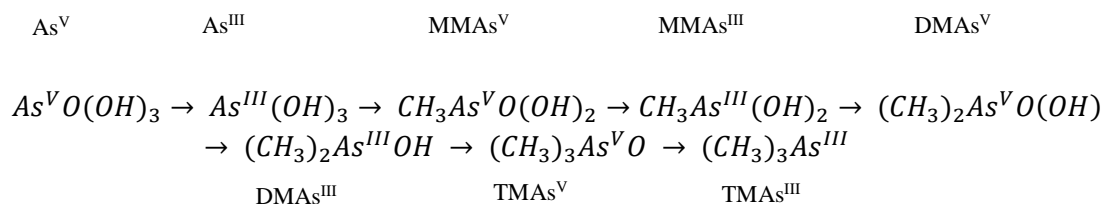


Figura 1.8 Reações envolvidas na destoxificação de espécies de arsénio<sup>III</sup> em organismos. Inicialmente uma arseno-redutase reduz o  $\text{As}^{\text{V}}$  a  $\text{As}^{\text{III}}$  que é posteriormente metilado a  $\text{MMAs}^{\text{V}}$ , contudo o arsénio pode ser continuamente reduzido e metilado até se obter trimetilarsino, que é excretado na urina.

Apesar de se tratar de um mecanismo de destoxificação, as espécies intermediárias de  $\text{As}^{\text{III}}$  que se formam como o  $\text{MMAs}^{\text{III}}$  ( $\text{CH}_3\text{As}^{\text{III}}(\text{OH})_2$ ) e o  $\text{DMAs}^{\text{III}}$  ( $(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{III}}(\text{OH})$ ) são tão ou mais reativas que as formas inorgânicas, apesar de serem mais solúveis que o arsénio inorgânico<sup>40,42</sup>.

Consoante o tempo de exposição a compostos inorgânicos e orgânicos de arsénio, os efeitos nocivos do metaloide sobre estruturas biológicas variam. Exposições pontuais ao arsénio são metabolizadas num curto período de tempo pelo mecanismo apresentado anteriormente, ou por outros mecanismos de destoxificação como a GSH. A exposição crónica ao arsénio poderá causar sintomas como hiper-queratose, hiper-pigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios nervosos, perda de unhas, eczema, problemas de rins e fígado estando também associado a casos de cancro de pulmão, pele, fígado, rins e bexiga o que evidencia o seu potencial carcinogénico a longo prazo. Os casos de intoxicação aguda são caracterizadas por vómitos, desidratação, alucinações e diarreia podendo, em casos extremos, conduzir à morte por falha hepática, renal ou ataque cardíaco<sup>23</sup>.

## 1.5 Proteínas de Transporte

O sistema cardiovascular representa o meio de distribuição por excelência de compostos, orgânicos ou inorgânicos, pelo organismo. É responsável pelo transporte e armazenamento de componentes essenciais assim como a sua mobilização e transporte para locais onde são necessários.

Também se encontra envolvido na remoção de metabolitos celulares e transporte dos mesmos até órgãos de excreção. O transporte de todos estes compostos, posteriormente à sua absorção, está associado maioritariamente a proteínas. Uma das funções de destaque das proteínas de transporte é a sua capacidade de conduzir compostos de forma a assegurar a sua libertação/mobilização de forma regulada, permitindo ao organismo realizar as suas funções vitais<sup>43</sup>.

As proteínas plasmáticas encontram-se organizadas por famílias de acordo com a sua estrutura e função. A maior família de proteínas que se pode encontrar no sangue é a das albuminas<sup>44</sup>. Outra família de proteínas de transporte é a das globinas que compreende a hemoglobina e mioglobina, como elementos de maior relevância. Existem também proteínas responsáveis pelo transporte e armazenamento de ferro (como a transferrina e mioglobina); proteínas transportadoras de hormonas, esteroides e vitaminas; e outras proteínas (como as selenoproteínas)<sup>43</sup>. É importante conhecer a interação de compostos como o ATO com proteínas de transporte, uma vez que a modulação desta interação poderá influenciar a sua disponibilidade e consequentemente o seu efeito tóxico ou terapêutico.

### 1.5.1 Albumina Sérica

As albuminas séricas são proteínas de transporte plasmático existentes em seres vertebrados e no plasma de mamíferos e são produzidas pelo fígado<sup>45</sup>. A sua concentração plasmática pode atingir valores que variam entre 35-55 g/L em indivíduos adultos. São responsáveis pelo transporte de metabolitos, hormonas e fármacos ou drogas assim como alguns iões<sup>46</sup>. Durante o seu tempo médio de vida (19 dias) passam milhares de vezes pelo mesmo local do organismo, recolhendo metabolitos nos locais de produção e libertando-os em locais de secreção. Para além da função transportadora, a albumina do soro humano (HSA) é responsável pela manutenção da pressão osmótica coloidal (ou oncótica), que é essencial para a distribuição de fluidos corporais entre compartimentos intravasculares e tecidos e ainda atua como ‘tampão’, contribuindo para a manutenção e balanço ácido/base no sangue. A família das albuminas relaciona-se estruturalmente e funcionalmente, sendo que os seus membros são caracterizados pela presença de 3 domínios homólogos com aproximadamente 190 resíduos de aminoácidos cada um e com 5 a 6 pontes de dissulfeto por domínio<sup>43</sup>.

A homologia estrutural entre as albuminas de soro humano (HSA) e bovino (BSA) é de 76%, no que diz respeito à sequência de aminoácidos. A estrutura primária da BSA é constituída por 583 aminoácidos e a HSA é constituída por 585 aminoácidos<sup>47</sup>, sendo que o peso molecular das albuminas de mamíferos ronda os 66’500 Dalton<sup>44</sup>.

O estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os grupos amina e carboxilo, dadores e aceitadores de hidrogénio, respetivamente, possibilita a formação da estrutura secundária. As albuminas são constituídas maioritariamente por hélices- $\alpha$  existindo também porções em *random coil*. O enrolamento destas estruturas por estabelecimento de ligações de hidrogénio intramoleculares, assim como a existência de 17 pontes de dissulfeto, permitem estabilizar a estrutura da BSA, mantendo a estrutura terciária definida por 3 domínios homólogos (I,II e III), sendo que cada um é constituído por dois subdomínios, A e B, com diferentes funções<sup>48</sup>. Globalmente a estrutura terciária da proteína tem formato de coração, informação obtida por um estudo cristalográfico contudo, devido à sua flexibilidade, não se pode afirmar que mantenha esta conformação em solução<sup>49</sup>.

A afinidade das albuminas estende-se a um grande número de ligandos com propriedades físico-químicas diferentes possuindo sete locais de ligação para ácidos gordos de cadeia média e longa, quatro locais para ligação de ácidos gordos de cadeia curta, dois locais de ligação para fármacos, um local de ligação para a bilirrubina, cinco locais com afinidade para a tioxina e outros locais seletivos para ligandos variados. Adicionalmente, estas proteínas têm ainda a capacidade de transportar catiões metálicos<sup>43,48,50</sup>.

O seu papel de *cluster* transportador influencia a farmacodinâmica e farmacocinética de alguns compostos usados em terapia assim como o poderá fazer com xenobióticos, influenciando a concentração de composto livre no plasma<sup>51</sup>. Quando ligandos com afinidade para locais de ligação da proteína se associam à mesma estabelecem forças intermoleculares que podem afetar as forças intramoleculares existentes, responsáveis pela manutenção da estrutura secundária da proteína, o que pode conduzir a alterações conformacionais<sup>52</sup>.

Tendo em conta o papel relevante da albumina na manutenção das condições do organismo, associado ao fato de esta ser uma proteína de transporte tão versátil no que diz respeito ao número de ligandos, torna-a num dos primeiros alvos para o estudo da sua interação com compostos bioativos.

### 1.5.2 Transferrina

A transferrina inclui-se no grupo de proteínas associadas ao transporte, armazenamento e metabolismo de Ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ), fazendo parte de processos cuidadosamente regulados<sup>43</sup>. Após a absorção de  $\text{Fe}^{+3}$  a nível intestinal e posteriores reações de redução/oxidação do catião metálico, consoante a sua fase do metabolismo, a transferrina liga  $\text{Fe}^{+3}$  transportando-o pela corrente sanguínea. A necessidade de uma proteína transportadora de Ferro, deve-se às reações de oxidação e redução catalisadas pelo catião metálico livre em condições fisiológicas, como a reação de Fenton.

Estruturalmente, a transferrina contém 679 aminoácidos<sup>53</sup>, perfazendo um peso molecular de 77'000 Da. É constituída por 2 lóbulos, o lóbulo N (amínico) com 336 aminoácidos e o C (carboxílico) com 343 ligados por uma porção em *random coil*. Cada lóbulo contém 2 domínios com uma série de hélices  $\alpha$  ligadas a um 'esqueleto' central constituído por folhas  $\beta$ . Estes domínios interagem formando uma cavidade hidrofóbica central onde o catião metálico estabelece interações eletrostáticas. A transferrina varia de conformação entre dois estados a apo-transferrina (sem  $\text{Fe}^{+3}$ ) e a holo-transferrina (com  $\text{Fe}^{+3}$ ). A holo-transferrina representa a conformação com afinidade para com os recetores de transferrina, existentes na membrana celular. Após a ligação recetor-transferrina, a proteína é endocitada e o pH ácido do endossoma promove a libertação de  $\text{Fe}^{+3}$ , uma vez que a afinidade ao catião diminui com o pH.

Estudos anteriores provaram a ligação de iões metálicos com interesse terapêutico como  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{VO}^{+2}$  e  $\text{Ti}^{+4}$  à transferrina. Da mesma forma, supõe-se que a proteína terá capacidade de transportar iões tóxicos como  $\text{Mn}^{+3}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  e  $\text{Pu}^{+4}$ <sup>54,55</sup>. Uma característica das células tumorais é a sobrepressão de recetores de transferrina na superfície celular, o que é indicativo da grande necessidade metabólica do catião metálico. Esta evidência torna a transferrina uma proteína com potencial terapêutico para o tratamento anti-cancerígeno<sup>56</sup>.

## 1.6 Alimentação Mediterrânica e Ácido Rosmarínico

Plantas aromáticas, ervas e especiarias são utilizadas há milhares de anos não só como condimentos alimentares mas também pelas suas propriedades medicinais<sup>57</sup>. De acordo com a OMS cerca de 80% da população do planeta, especialmente a população em países subdesenvolvidos, depende de ervas aromáticas para a criação de formulações terapêuticas. O interesse nestas como fontes de compostos orgânicos com propriedades de interesse, pode ser aplicado à indústria alimentar como conservante ou aditivo alimentar, à medicina/farmacologia como antimicrobiano, antioxidante ou anticancerígeno. Esta evidência tem levado à investigação em extratos vegetais das atividades biológicas dos compostos orgânicos presentes nestas plantas.

As espécies de plantas da família das *Lamiaceae* encontram-se disseminadas pela região do Mediterrâneo, sendo que muitas das plantas pertencentes a esta família são utilizadas como especiarias na alimentação<sup>58</sup>. Espécies como *Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Thymus vulgaris* (Tomilho) e

*Origanum vulgare* (Orégãos) são exemplos das especiarias utilizadas no cotidiano, pertencentes à família das *Lamiaceae*<sup>59</sup> e encontram-se representadas na Figura 1.9. Estas plantas aromáticas são constituídas por substâncias como polifenóis, quininas, flavonóides alcalóides, polipéptidos ou derivados oxigenados<sup>60,61</sup>.



Figura 1.9 Espécies da família *Lamiaceae*: *Rosmarinis officinalis* (A); *Thymus vulgaris* (B); *Origanum vulgare* (C).

Entre os compostos descritos, o ácido rosmarínico (RA) é um dos polifenóis mais abundantes nas espécies da família das *Lamiaceae*. O RA, representado na Figura 1.10 B é comumente descrito na literatura como um éster do ácido cafeico (Figura 1.10 A), apresentado um conjunto de derivados identificados em várias espécies vegetais.

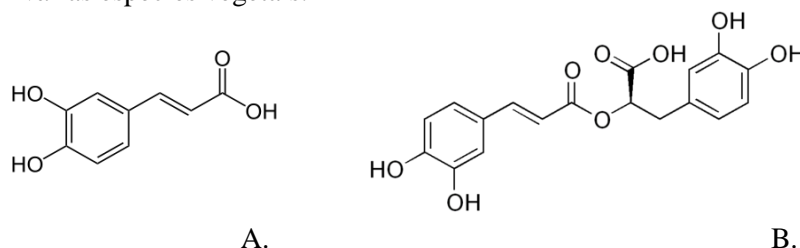


Figura 1.10 Estrutura do ácido cafeico (A), retirado de: <http://www.fcencias.com/2013/03/14/molecula-da-semana-acido-cafeico/> ácido rosmarínico (B) adaptado de<sup>62</sup>

A L-fenilalanina e a L-tirosina são aminoácidos precursores da biossíntese de RA em espécies da família das *Lamiaceae*<sup>62</sup>. O RA possui variadas atividades biológicas sendo estas as capacidades de atuar como adstringente, como antioxidante<sup>63</sup>, como anti-inflamatório, como antibacteriano e como antiviral<sup>64</sup>. Um exemplo da sua capacidade antiviral é o uso de extratos de *Melissa officinalis* contra infecções pelo *Herpes simplex*<sup>65</sup>.

Outros estudos realizados com RA indicam que o polifenol poderá ter capacidade inibitória de enzimas digestivas, nomeadamente a  $\alpha$ -amilase. A modificação química de enzimas está muitas vezes associada à perda de função biológica, se a ligação se efetuar em locais que alterem o local ativo da enzima.

Em sistemas biológicos multicelulares o mecanismo de transporte de RA poderá estar associado às albuminas. Estudos com RA provaram a capacidade do RA de estabelecer interações entre o fenol e as proteínas, tanto para o caso da albumina bovina como da albumina humana<sup>66,67</sup>. As propriedades do RA que lhe conferem potencial farmacológico aliadas à capacidade de se ser transportado por albuminas na corrente sanguínea e a sua influência em enzimas digestivas poderão influenciar a absorção do RA e consequentemente o transporte e metabolização do ATO aquando da ingestão do mesmo em águas contaminadas com o metaloide. Por outro lado, também o consumo de espécies com RA poderá afetar o efeito terapêutico do ATO. Torna-se então importante conhecer o efeito do ATO na presença de RA.



## **2. Objetivos**



A toxicidade do trióxido de arsénio (ATO) em sistemas biológicos encontra-se extensivamente descrita na bibliografia e está associada a efeitos agudos e crónicos especialmente em populações economicamente desfavorecidas. Contudo, o ATO pode ser usado como composto terapêutico levando à remissão da Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

Neste trabalho, pretende-se saber se será possível modular a bioatividade do ATO em sistemas biológicos através de proteínas de transporte. Pretende-se saber também se fitoquímicos não tóxicos, facilmente acessíveis e com capacidade de se associarem a proteínas de transporte poderão ter algum papel na modulação da atividade do ATO. Para tal, procederam-se a estudos com o objetivo de:

- 1) Determinar a toxicidade do ATO a nível celular, usando como modelo células HeLa, na presença de proteínas de transporte como a BSA e a transferrina, na sua concentração plasmática;
- 2) Avaliar se a presença de RA, um polifenol abundante em ervas aromáticas com capacidade de se ligar a proteínas de transporte influencia a toxicidade do ATO, na presença das mesmas.
- 3) Determinar que efeito o ATO tem sobre a estrutura de proteínas de transporte e quantificar a sua estequiometria na ausência e presença de ligandos conhecidos;
- 4) Verificar se a concentração de RA em três espécies de ervas aromáticas da família das *Lamiaceae*, como *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* poderá ser significativa para a modulação pretendida da toxicidade do arsénio.



### **3. Procedimento Experimental**



### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes

A albumina sérica bovina (BSA) e a apo-transferrina assim como o cloreto de Ferro III (*'Eisen Chloride'*), hidróxido de sódio (NaOH), foram obtidos de Sigma-Aldrich®. O ácido fórmico (para água acidificada com 0,05% de ácido fórmico) e o ácido rosmarínico (RA), utilizado como padrão no sistema HPLC-DAD também foram obtidos à Sigma-Aldrich®. O trióxido de arsénio (ATO, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), o ácido hidrocloreídrico 37% (HCl) e o iodato de potássio (KIO<sub>3</sub>) assim como o MeOH, foram obtidos de Merck®. Os reagentes envolvidos na preparação do tampão fosfato de potássio 50,00 mM com 100,00 mM de NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato de potássio dibásico) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato de potássio monobásico), acetado de sódio (NaCH<sub>2</sub>COOH) e ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) também foram obtidos de Merck®. O Leucocristal Violeta foi adquirido de MP Biomedicals®. O meio de cultura, RPMI-1640, assim como a tripsina 10×, L-glutamina e o *pen-strep* foram obtidos a Lonza BioWhittaker®. O MTT foi obtido de VWR®.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Preparação de Soluções

Todas as soluções obtidas por dissolução de sais foram preparadas previamente e em volumes e concentrações superiores de forma a manter as condições experimentais em todos os ensaios realizados. As soluções proteicas foram preparadas imediatamente antes da realização dos estudos espectrofotométricos e de viabilidade celular, por dissolução do material proteico liofilizado em tampão isoosmótico de fosfatos 50,00 mM, pH 7,4 com 100,00 mM de NaCl.

Inicialmente preparou-se uma solução-tampão fosfatos 50,00 mM por dissolução da respetiva massa de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e NaCl para o volume final de 1,00 L. O pH foi ajustado com HCL 37% e NaOH 1M com um medidor de pH InoLac®. Para os estudos com a transferrina preparou-se uma solução de FeCl<sub>3</sub> 1,00 mM em tampão k-fosfatos isoosmótico. A solução de ATO 5,00 mM foi preparada em água alcalinizada com NaOH 1,00 M, de forma a facilitar a formação de arsenitos e foi renovada mensalmente de forma a garantir a estabilidade da solução. Todas as concentrações de ATO referidas neste trabalho laboratorial foram obtidas por diluição desta solução inicial. Para a metodologia utilizada para a quantificação de ATO em água preparou-se uma solução tampão NaCH<sub>2</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COOH 200,00 mM, pH 4,2 acertado com um medidor de pH InoLac®. A solução de azul leucocristal 0,05%, foi preparada em ácido ortofosfórico 0,03%.

#### 3.2.2 Manutenção de Linhas Celulares e Ensaio de Citotoxicidade

Os estudos de toxicidade foram realizados na linha celular: HeLa Kyoto (#ATCC®CCL-2™), células humanas do adenocarcinoma cervical.

A linha celular HeLa foi mantida em frascos de cultura de células T25 VWR® *Tissue Culture Flask*, sob uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°, numa estufa *Shel Lab CO2 Series* da Sheldon Mfg.Inc®. Para o crescimento celular utilizou-se o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, FBS e antibiótico *pen-strep*. As células foram tripsinizadas a cada 48 horas ou ao atingirem confluência próxima de 90%.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com o protocolo descrito anteriormente<sup>19</sup>. Semearam-se 6'000 células por poço, em microplacas de 96 poços VWR® *Tissue Culture Plate*. Após 48 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> removeu-se o meio e aplicaram-se

100,00µL das soluções a testar por poço. As soluções aplicadas nas células HeLa foram preparadas em meio RPMI não suplementado com FBS, devido ao seu conteúdo em proteínas de transporte, para um volume final de 2,00 mL, de forma a avaliar a toxicidade de concentrações crescentes de 0 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 15 µM; e 20,00 µM de ATO. Para analisar a toxicidade à concentração plasmática das proteínas de transporte preparou-se uma solução de BSA 80,00 mg/mL (1203,00 µM) e aplicaram-se 40,00 mg/mL (601,50 µM) de proteína em cada poço. Para o ensaio com BSA-RA (complexo entre BSA e ácido rosmarínico) partiu-se de uma solução de ácido rosmarínico (RA) 2,40 mM que foi diluída, obtendo-se a proporção final de 1:1 com a BSA. Para a apo-transferrina preparou-se uma solução concentrada de 5,20 mg/mL (67,53 µM), que foi diluída para 2,60 mg/mL (33,77 µM). O ensaio com a holo-transferrina envolveu a preparação prévia da solução proteica e adição de FeCl<sub>3</sub>, na proporção de 1:3 (101,13 µM) para com a apo-transferrina. As células foram incubadas com as soluções por um período de 48 horas.

Posteriormente removeram-se as soluções-teste e adicionaram-se 100,00 µL/poço de uma solução de 0,50 mg/mL de MTT. Após a incubação nas condições anteriormente referidas removeu-se a solução de MTT e adicionaram-se 200,00 µL de MeOH. Leu-se a absorvência dos poços a 595 nm num leitor de microplacas Tecan® Sunrise.

Os ensaios foram realizados em 8 × 2 replicados. Os valores de absorvências correspondentes a cada uma das concentrações em estudo de ATO foram comparados com as médias dos valores dos controlos, também incubados nas mesmas condições. Assim, a viabilidade celular é definida pela expressão:

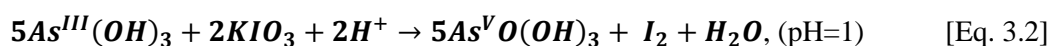
$$VC(\%) = 100 \times \left( \frac{ABS \text{ Amostra}}{Média \text{ ABS Controlo}} \right) \quad [\text{Eq. 3.1}]$$

sendo, VC a viabilidade celular expressa em percentagem, *ABS Amostra* a absorvência de cada um dos replicados para cada concentração de ATO e a *Média ABS Controlo* corresponde à média dos 8 replicados do ensaio de controlo.

Obtiveram-se 8 retas por regressão linear das percentagens de viabilidade celular em função da concentração de ATO, com que as células foram incubadas. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos pela média dos 8 valores determinados pelas regressões lineares. Procedeu-se da mesma forma para o cálculo do desvio padrão.

### 3.2.3 Determinação da Estequiometria da Ligação Proteína-ATO

A determinação da estequiometria de ligação arsénio-proteína foi realizada em duas etapas, uma para separação de arsénio livre e do complexo arsénio-proteína e uma outra para quantificação do ATO livre em solução, tornando possível o cálculo do número de átomos de ATO associados à proteína. A quantificação foi realizada através de um método colorimétrico na qual o arsénio trivalente é oxidado a arsénio pentavalente, a pH próximo de 1, libertando iodo (I<sub>2</sub>)<sup>68</sup> que oxida o azul leucocristal a violeta cristal, absorvendo a 590nm<sup>69</sup>. As Equações 3.2 e 3.3 representam os dois passos que ocorrem na reação.



O arsénio trivalente é oxidado a arsénio pentavalente com libertação de iodo, a pH 1. Posteriormente, o iodo oxida o azul leucocristal a violeta cristal a pH 4,2<sup>70</sup>.



### 3.2.3.1 Separação Arsénio-livre vs Arsénio-Proteína

De forma a quantificar a quantidade de moléculas de arsénio que se ligam à BSA procedeu-se à centrifugação de amostras contendo 15,00  $\mu\text{M}$  de BSA e 150,00  $\mu\text{M}$  de ATO, na proporção de 1 de proteína para 10 de arsénio trivalente, na presença de compostos orgânicos (ácido rosmarínico, quercetina, ácido láurico) associados à BSA e na presença de  $\text{Fe}^{+3}$ , associado à transferrina. Como controlo preparou-se uma solução contendo 150,00  $\mu\text{M}$  de ATO (controlo de ATO) para eliminar quaisquer interferências por adsorção de ATO à membrana do *centricon*, sendo este valor usado como referência da solução de arsénio livre. Preparou-se outra solução contendo apenas proteína (controlo com proteína) para excluir quaisquer interferências que os compostos orgânicos possam surtir no método de quantificação.

Para o ensaio com a holo-transferrina, a apo-transferrina foi incubada com  $\text{Fe}^{3+}$  por 2 horas e só depois foi adicionado o composto em estudo também por um período de 2 horas. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente. De acordo com as concentrações acima referidas prepararam-se soluções de 1,00mL e colocaram-se 500,00  $\mu\text{L}$  em *centricons*, Nanosep® *Centrifugal Devices*.

Previamente ao protocolo de quantificação, incubou-se a BSA, por 24 horas, com os compostos orgânicos. O ensaio para quantificação da estequiometria da solução de BSA na presença de RA iniciou-se com a preparação de uma solução 150,00  $\mu\text{M}$  de RA e uma solução de 150,00  $\mu\text{M}$  de BSA. Adicionou-se o mesmo volume das duas soluções obtendo-se uma solução de 75,00  $\mu\text{M}$  de cada um dos compostos.

A quercetina foi dissolvida em MeOH, numa concentração de 150,00 mM e diluída para 150,00  $\mu\text{M}$  em tampão K-fosfatos<sup>71</sup>.

O ácido láurico foi dissolvido em tampão k-fosfatos a 50 °C na proporção de 60:1 com a BSA<sup>45</sup>. Usou-se uma solução inicial de 9,00 mM de ácido láurico e incubou-se a concentração de ácido láurico 4,50 mM com 75,00  $\mu\text{M}$  de proteína.

As soluções foram incubadas por 24 horas à temperatura ambiente, previamente à adição de ATO, que incubou por 2 horas antes da centrifugação.

Após 24 horas de incubação adicionou-se o ATO para se obterem as proporções de proteína 1:0 (controlo com proteína) de ATO e a proporção de proteína 1:10 de ATO. Também se leu a absorvência da solução com 150,00 $\mu\text{M}$  de ATO (controlo de ATO).

Procedeu-se da mesma forma para com a apo- e a holo-transferrina. As concentrações das soluções iniciais foram de 150,00  $\mu\text{M}$  e incubadas por 2 horas com o composto em estudo. No caso da holo-transferrina adicionaram-se 45,00  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  à solução proteína, incubou-se por 2 horas e posteriormente adicionou-se o ATO. Seguidamente as soluções nos *centricons* foram centrifugadas a 0,20×1000 g.

A Figura 3.1 representa o esquema utilizado para a separação do ATO livre e do complexo ATO-proteína. Retiraram-se 100,00  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras e diluiu-se para o volume final de 400,00 $\mu\text{L}$  em tampão K-fosfatos. Fizeram-se os ensaios em triplicado.

Traçou-se uma reta de calibração para cada um dos ensaios. Por diluição da solução de ATO 5,00 mM preparou-se uma solução de 500,00  $\mu\text{M}$  de ATO. Por diluição desta, obtiveram-se as concentrações de 0,00; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00 e 50,00  $\mu\text{M}$  para o volume final de 400  $\mu\text{L}$ . Todas as soluções foram preparadas de forma semelhante com excepção do ensaio da holo-transferrina na qual foram introduzidos 45  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{+3}$ , a cada uma das amostras. Os coeficientes de ajuste das retas de calibração encontram-se no Anexo 7.1. O protocolo inicial descrito em *Kamaya et al.*<sup>70</sup> foi diluído 10 vezes introduzindo-se 100,00 $\mu\text{L}$  de  $\text{KIO}_3$  seguidos de 50,00  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M e incubados por 2 minutos. Seguidamente adicionaram-se 200,00  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio/ácido acético 200,00 mM, pH 4,2. Por fim adicionaram-se 50,00  $\mu\text{L}$  da solução de leucocristal azul 0,05% e as amostras foram colocadas a incubar 5 minutos a 40°C para desenvolvimento de cor.

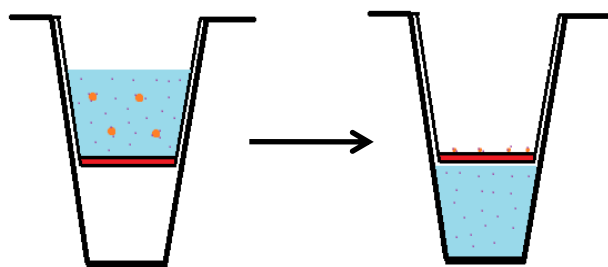


Figura 3.1 – Esquema de centrifugação para separação do arsênio livre do arsênio (roxo) ligado ao complexo proteína-ATO (laranja).

### 3.2.3.2 Tratamento de Resultados

Cada valor de absorvência foi associado à concentração de arsênio nos 400,00  $\mu\text{L}$  de solução antes da adição dos restantes. Partindo da concentração nos 400,00  $\mu\text{L}$  calculou-se o número de moléculas de ATO livre nos 500,00  $\mu\text{L}$ . Seguidamente procedeu-se ao cálculo do número de moléculas por molécula de proteína. Subtraiu-se o controlo da proteína, sem ATO, à amostra na proporção de 1 de proteína para 10 de ATO. Este último valor foi subtraído ao controlo de arsênio. Os resultados foram avaliados e no caso de haver interferências (avaliadas pelo controlo de proteína sem ATO) procedeu-se à subtração dos valores obtidos para a proporção de 1:10. Ao resultado da quantificação da amostra controlo com ATO, foram subtraídos então os valores obtidos para a proporção de 1:10, de acordo com a Equação 3.4:

$$\text{Proteína} - \text{ATO} = \text{Controlo ATO} - [(\text{Proteína 1:10 ATO}) - (\text{Proteína 1:0 ATO})] \quad [\text{Eq. 3.4}]$$

sendo que, *Proteína-ATO* indica o quantidade de ATO que se associou à proteína; o *controlo de ATO* diz respeito à quantidade de ATO na amostra; *Proteína 1:10 ATO* é a amostra com proteína na proporção de 1:10 de arsênio e *Proteína 1:0 ATO* é o controlo de proteína.

Assim, foi possível calcular a concentração de arsênio que está associado à proteína. Os valores foram calculados em triplicado, as subtrações foram realizadas consoante a Lei de Propagação de Incerteza e os resultados foram divididos por  $7,5 \times 10^{-9}$  (número de moléculas numa solução de 15,00  $\mu\text{M}$  de proteína) obtendo-se a média e o desvio padrão associado a cada um dos valores.

## 3.3 Análise estrutural de Proteínas

### 3.3.1 Uv-Visível

Para avaliação da absorção na região do Uv-Visível preparou-se uma solução inicial de 8,00 mg/mL de BSA (120,30  $\mu\text{M}$ ) e apo-transferrina (103,90  $\mu\text{M}$ ). A solução proteica foi diluída para 0,40 mg/mL (6,02  $\mu\text{M}$  de BSA e 5,20  $\mu\text{M}$  de apo-transferrina) em tampão fosfatos 50,00 mM, pH 7,4 para leitura no espectrofotómetro de acordo com estudos semelhantes<sup>72</sup>. Para avaliar o efeito das diferentes concentrações de ATO e  $\text{FeCl}_3$  na absorvência da proteína foram preparadas soluções por diluição da solução de 1,00 mM de  $\text{Fe}^{+3}$  e 5,00 mM de ATO para as concentrações indicadas em cada ensaio. Todas as medições foram realizadas num espectrofotómetro Jasco V560 e os espectros foram obtidos entre 250-340 nm. Mediu-se a absorvência a 280 nm para efeitos de comparação entre espectros de amostras. As medições foram realizadas com *cuvettes* de quartzo com 1 cm. Aos espectros da proteína incubada

com composto foram subtraídos os espectros dos compostos diluídos em tampão fosfatos 50,00 mM, pH 7,4, à temperatura ambiente.

### 3.3.2 Fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados num fluorímetro Fluorolog®3-22 Spectra CQ Horiba Jobin Yvon, equipado com um detetor TBX-PS, com cuvettes de quartzo de 1cm. Os espectros de emissão e absorção da proteína assim como das soluções iônicas foram obtidos sob o comprimento de onda de excitação de 280 nm. O comprimento de onda de emissão foi medido a 355 nm para a BSA e a 340 nm para a transferrina.

As soluções proteicas foram obtidas por preparação de uma solução inicial de 40,00 mg/mL e diluídas para 0,40 mg/mL de BSA e apo-transferrina para um volume final de 3,00 mL, concentrações semelhantes às descritas em protocolos anteriores<sup>71,73</sup>. De forma semelhante também as concentrações de ATO foram obtidas por diluição da solução inicial 1,00 mM para um volume final de 3,00 mL, de forma a serem atingidas as concentrações de 167,67  $\mu$ M e 333,33  $\mu$ M de ATO. Procedeu-se da mesma forma para obter as concentrações de FeCl<sub>3</sub> estudadas. O procedimento experimental foi executado de forma semelhante para as duas proteínas em estudo.

### 3.3.3 FT-IR

Os ensaios para avaliação da estrutura secundária foram realizados num aparelho de FT-IR Nicolette 6700 da Thermo Electron Corporation®. A análise por FT-IR focou-se sobre banda da Amida I (1700-1600 cm<sup>-1</sup>) e foi realizada em D<sub>2</sub>O. A banda da Amida I fornece informação estrutural da proteína, nomeadamente sobre o conteúdo em Hélices- $\alpha$ , Folhas plissadas- $\beta$ ,  $\beta$ -turns e porções em random coil como representado na Tabela 3.1.

Os sais para a formulação do tampão fosfatos 50,00 mM, pH 7,4, foram pesados previamente e deixados a secar na estufa a 60 °C, na presença de sílica por 24 horas. Todos os compostos com exceção do ATO foram diluídos em tampão k-fosfatos em D<sub>2</sub>O.

As amostras proteicas foram dissolvidas em tampão k-fosfatos numa concentração de 80,00 mg/mL, posteriormente diluídas para 32,00 mg/mL (481,20  $\mu$ M de BSA e 415,58  $\mu$ M de apo-transferrina). Preparou-se uma solução inicial de 15,00 mM de ATO em D<sub>2</sub>O que foi diluída para obter as proporções com a proteína posteriormente descritas. A BSA foi incubada com o ácido rosmarínico por 2 horas e adicionaram-se as concentrações de ATO nas proporções de 1:3 (1254,60  $\mu$ M); 1:5 (2091,00  $\mu$ M) e 1:10 (4180,00  $\mu$ M) de proteína-ATO. A solução de FeCl<sub>3</sub> 15,00 mM foi preparada em D<sub>2</sub>O e adicionada na proporção de 1:3 para com a apo-transferrina o que corresponde a uma concentração final de 1246,74  $\mu$ M de Fe<sup>+3</sup>. A transferrina foi incubada previamente com o ião ligante por 2 horas e só depois é que se adicionou ATO na proporção de 1:2 (830,36  $\mu$ M), 1:5 (2077,99  $\mu$ M) e 1:10 (4155,80  $\mu$ M). As amostras foram preparadas para um volume final de 200,00  $\mu$ L e foram incubadas sob uma atmosfera de azoto.

Os espectros obtidos foram processados com o software OMNIC™ *Series software* da Thermo Fisher Scientific. A todos espectros foi descontado o ruído da água, lido em separado. A segunda derivada de Norris-Williams foi obtida com 3 pontos e *gap* de 1 ponto.

Foram lidos os espectros de ATO; Fe<sup>+3</sup>; ATO+Fe<sup>+3</sup>; ATO+RA e RA, dissolvidos e diluídos no tampão k-fosfatos acima descrito. Aos espectros das soluções proteicas foi descontado o respetivo espectro da solução com o composto lido individualmente.

Como forma de confirmação da informação dos espectros procedeu-se ao cálculo do rácio entre absorvência de Folhas plissadas- $\beta$ / hélices- $\alpha$ , determinados consoante o número de onda de absorção máxima da banda da Amida I de cada uma das proteínas, como discutido posteriormente.

Tabela 3.1 Números de onda, médias e desvios em D<sub>2</sub>O, dos motivos de estrutura secundária de proteínas<sup>74</sup>.

Estrutura secundária	Posição da banda (cm <sup>-1</sup> ) em D <sub>2</sub> O	
	Média	Extremos
Hélices- $\alpha$	1652	1642-1660
Folhas plissadas- $\beta$	1630	1615-1638
	1679	1672-1694
$\beta$ -Turns	1671	1653-1691
Random coil	1645	1639-1654

### 3.3.4 Quantificação Protéica

Com o intuito de averiguar se a proteína precipita na presença de ATO quantificou-se a proteína em solução recorrendo ao Método de Bradford<sup>75</sup>. Traçou-se uma reta de calibração após leitura de absorvências, em triplicado, de soluções contendo 0,00  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,00  $\mu\text{g/mL}$ ; 4,00  $\mu\text{g/mL}$ ; 6,00  $\mu\text{g/mL}$ ; 8,00  $\mu\text{g/mL}$ ; 10,00  $\mu\text{g/mL}$  de proteína, obtidas por diluição de uma solução inicial de 0,8 mg/mL de proteína para um volume final de 800,00  $\mu\text{L}$  à qual se adicionaram 200,00  $\mu\text{L}$  de Reagente de Bradford.

As soluções teste foram incubadas com as concentrações de 0,00  $\mu\text{M}$ , 50,00  $\mu\text{M}$ , 200,00  $\mu\text{M}$  e 800,00  $\mu\text{M}$  de ATO obtido pela diluição da solução inicial de 5,00 mM, incubadas na presença de 10,00  $\mu\text{g/mL}$  de BSA para um volume final de 1,00 mL. Procedeu-se da mesma forma para com a apo-transferrina, contudo a concentração de proteína durante a incubação foi de 4,00  $\mu\text{g/mL}$  incubadas com as concentrações de 0,00  $\mu\text{M}$ , 100,00  $\mu\text{M}$ , 400,00  $\mu\text{M}$  e 600,00  $\mu\text{M}$  de ATO. As soluções foram deixadas incubar entre 1 horas e 30 minutos a 2 horas e sem ressuspensão. Retiraram-se amostras de 800,00  $\mu\text{L}$  à qual foram adicionados 200,00  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford.

## 3.4 Preparação de Extratos em plantas aromáticas

### 3.4.1 Preparação de decocções

O material vegetal foi obtido num estabelecimento comercial. Prepararam-se extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégãos). Foi realizada uma decocção por cozimento de 10,00 gramas de material vegetal em 100,00 mL de água desionizada em ebulição por 10 minutos. Seguidamente a solução foi filtrada por filtros Whatman® n°1, congelada e posteriormente liofilizada num liofilizador Heto Power Dry LL 3000.

### 3.4.2 Quantificação de ácido rosmarínico em extratos aquosos

A quantificação de RA foi realizada num sistema de cromatografia líquida de alta resolução Finnigan™ Surveyor Plus Thermo Scientific com uma coluna LichroCART® 250-4LiChrospher® 100RP-18 (5 $\mu\text{m}$ ) e um detetor DAD (dyode array detector). Os dados foram processados com o software Xcalibur™ Thermo Scientific. Para a eluição utilizaram-se duas fases móveis A (água acidificada com 0,05% de ácido fórmico) e B (MeOH), com o gradiente de eluição: 0 minutos 80% A e 20 % B; 20 minutos 20 % A e 80 % de B; 25 minutos 20% A e 80 % B, com um fluxo de 1,00 mL/min.

Preparou-se uma solução inicial de RA 10,00 mg/mL (27,76 mM) em água MiliQ, posteriormente diluída para 100,00 $\mu\text{M}$ . A partir desta prepararam-se as soluções com concentrações de

0,00  $\mu\text{M}$ ; 10,00  $\mu\text{M}$ ; 30,00  $\mu\text{M}$ ; 50,00  $\mu\text{M}$ ; 70,00  $\mu\text{M}$  e 100,00  $\mu\text{M}$ , para o traçado da reta de calibração. Os cromatogramas foram obtidos em *Total-Range Wavelength* (200-600 nm) e a quantificação do RA nos extratos foi realizada tendo em conta o comprimento de onda de 330nm.

### **3.4.3 Digestão Gastrointestinal *In Vitro***

#### **3.4.3.1 Digestão Gástrica**

Utilizou-se suco gástrico artificial consistindo em 3,20 mg/mL de pepsina, dissolvida numa solução de 2,00 mg/ml de NaCl, pH 1,2<sup>76</sup>. Colocou-se o mesmo volume de extrato aquoso (4,00 mg/mL) de suco gástrico. Deixou-se incubar a 37°C durante 4 horas. Foram retiradas amostras (500,00  $\mu\text{L}$ ) aos tempos de 0 e 4 horas, diluídas com o fator de diluição 1:2 em 500,00  $\mu\text{L}$  de metanol gelado e deixadas no congelador. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas e sobrenadante foi injetado diretamente e analisado por HPLC-DAD. Como controlos utilizaram-se duas soluções, uma com extrato (controlo C1) e outra com suco gátrico (Controlo C2) para efeito de desconto e processamento de cromatogramas no EXCEL. A percentagem de RA em 1,00 mg/mL de extrato aquoso foi realizada pela razão entre área do pico correspondente ao RA nas amostras e o pico correspondente ao RA do controlo.

#### **3.4.3.2 Digestão Intestinal**

Preparou-se de suco pancreático artificial com 25,00 mg/mL de pancreatina dissolvida em tampão fosfato de potássio 50,00 mM, pH 8<sup>76</sup>. Colocou-se o mesmo volume de extrato aquoso liofilizado (4,00 mg/mL) e de suco pancreático. Deixou-se a incubar a 37°C durante 4 horas. Foram retiradas amostras (500,00  $\mu\text{L}$ ) aos tempos de 0 e 4 horas, adicionaram-se 500,00  $\mu\text{L}$  em metanol gelado e deixadas no congelador. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas e sobrenadante foi injetado diretamente e analisado por HPLC-DAD. Como controlos utilizaram-se duas soluções, uma com extrato (controlo C1) e outra com suco pancreático (Controlo C2) para efeito de desconto e processamento de cromatogramas no EXCEL. A percentagem de RA em 1,00 mg/mL de extrato aquoso foi realizada pela razão entre área do pico correspondente ao RA nas amostras e o pico correspondente ao RA do controlo.



## **4. Resultados e Discussão**





## 4.1 Ação Biológica ATO em células HeLa

A citotoxicidade do trióxido de arsênio (ATO) para células HeLa Kyoto foi avaliada através do ensaio de MTT, na ausência e presença de BSA (albumina de soro bovino) e de BSA-RA (complexo formado entre BSA e ácido rosmarínico). Em células metabolicamente ativas, a enzima succinato desidrogenase tem capacidade de reduzir o MTT a formazan que apresenta uma cor roxa e possui um comprimento de onda máximo de absorção de 595 nm. Assim, é possível estabelecer uma relação entre a absorvência de uma amostra e a quantidade de células metabolicamente ativas.

### 4.1.1 Citotoxicidade do ATO na presença de BSA

A Figura 4.1 representa o perfil de citotoxicidade do trióxido de arsênio (ATO) em concentrações crescentes. O aumento da percentagem de viabilidade celular na concentração de 1,00  $\mu\text{M}$  poderá não ser significativo devido ao erro associado à medição.

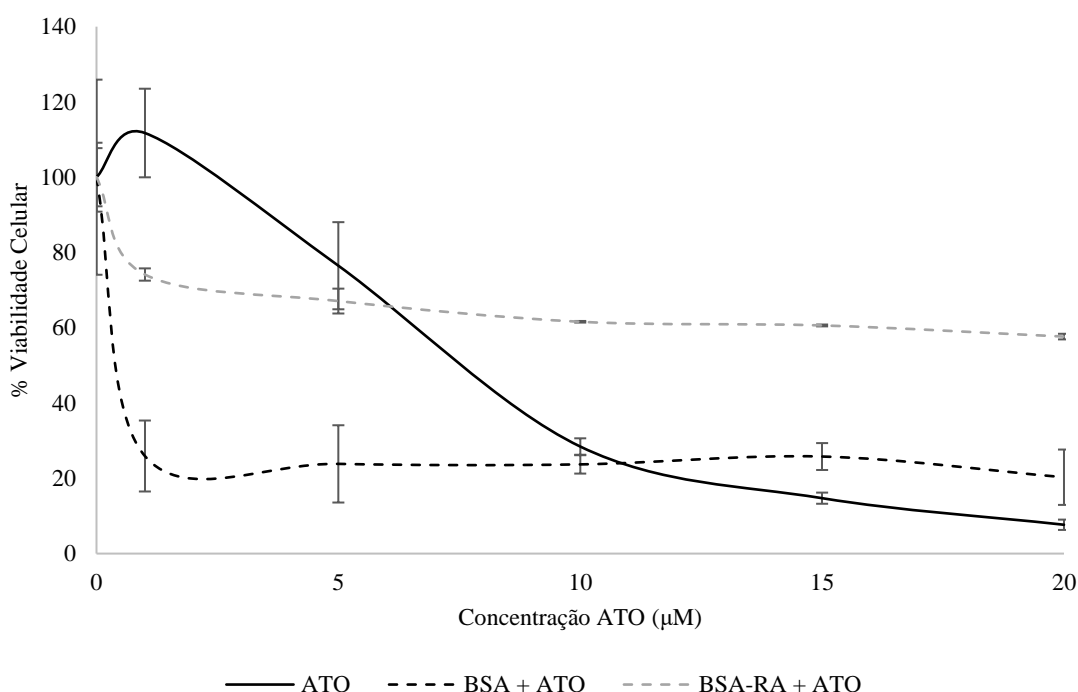


Figura 4.1 Perfil de citotoxicidade obtido pelo ensaio de MTT do composto ATO sobre a linha celular HeLa Kyoto, incubada com 40,00 mg/mL (601,50 $\mu\text{M}$ ) de BSA e BSA-RA, sobre concentrações crescentes de ATO. As concentrações de ATO estudadas (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) encontram-se apresentadas com os respectivos desvios padrão associados com os desvios padrão associados (8 $\times$ 2 replicados).

A incubação das células HeLa na presença de 40,00 mg/mL de BSA com as mesmas concentrações de ATO causou uma diminuição acentuada da viabilidade celular, estabilizando próximo do 20% de viabilidade celular. Este valor mantém-se ao longo da gama de concentrações estudadas. O perfil de citotoxicidade na presença de BSA cruza o do ATO perto da concentração de 12,00  $\mu\text{M}$  de composto. A partir desta concentração não se observa a morte celular abaixo dos 20% em contraste com o ATO. Observa-se que após a incubação com BSA os valores de  $\text{IC}_{50}$  indicados na Tabela 4.1 diminuem de  $7,69 \pm 0,37 \mu\text{M}$  para  $0,61 \pm 0,19 \mu\text{M}$  de ATO. Na presença de BSA a toxicidade do ATO para as células HeLa aumenta relativamente à toxicidade do ATO isolado. A BSA poderá desempenhar um papel de transportador entregando o ATO às células mesmo a concentrações mais baixas. Para

concentrações mais elevadas a BSA poderá atuar como destoxicante por associação do ATO à proteína, regulando a sua libertação para as células. Sabe-se que a toxicidade do ATO é exercida pela sua capacidade em gerar peróxido de hidrogénio, que potencia a formação de ROS, em condições fisiológicas. Em estudos anteriores, observou-se que os efeitos tóxicos do ATO exercem-se por geração de ROS em estruturas celulares sendo estes diminuídos na presença de catalase e SOD. Também a diminuição de GSH na células<sup>77</sup> foi observada após a exposição das mesmas a ATO. Estes dados suportam que a toxicidade *in vitro* possam ser causados pela geração de ROS após exposição ao ATO.

Testou-se também o efeito do ATO na presença de BSA-RA na concentração de 1:1 com a proteína (601,50 µM) e observou-se uma diminuição da viabilidade celular para 80%, para concentração de 1,00 µM de ATO. Para concentrações superiores a 1,00 µM de ATO, observa-se uma descida menos acentuada até se atingir um valor de viabilidade celular de 60%. Relativamente ao ensaio da BSA-RA observa-se um aumento do valor de IC<sub>50</sub> para 27,76 ± 0,76 µM. Este valor foi obtido por extrapolação dos resultados, como descrito no Capítulo 3.2.2. Estudos anteriores realizados com RA em células humanas determinaram que o mesmo não é tóxico<sup>78</sup>. As concentrações em que se observou toxicidade são superiores às utilizadas neste estudo, o que é indicativo de que o RA não exerce um efeito tóxico para células humanas. Na presença de BSA-RA observa-se uma diminuição acentuada da toxicidade do ATO, o que pode dever-se ao efeito antioxidante RA<sup>79</sup>. Estudos realizadas em células de ovário de hamster chinês (GL-K1) indicam que a presença de antioxidantes têm capacidade de reduzir o stress oxidativo, induzido pelo ATO, diminuindo o número de células apoptóticas<sup>80</sup>, o que poderá ser indicativo de que o dano oxidativo diminui na presença de antioxidantes. Esta evidência vai de encontro ao resultado observado no ensaio de citotoxicidade com ATO e BSA-RA, indicando um papel protetor do RA perante o composto em estudo.

A BSA poderá exercer um papel de transporte do ATO entregando o composto diretamente às células. Em concentrações elevadas não se observa aumento da citotoxicidade o que poderá indicar um papel citoprotetora da BSA. O RA em conjunto com a BSA é eficaz na redução da toxicidade do ATO.

Tabela 4.1 Valores de IC<sub>50</sub> e respetivos desvios padrão, obtidos no ensaio de MTT para as células HeLa após incubação com BSA na concentração de 40,00 mg/mL (601,50µM) com os desvios padrão associados (8×2 replicados).

	IC <sub>50</sub> para células HeLa (µM)
<b>ATO</b>	7,69 ±0,37
<b>BSA+ATO</b>	0,61± 0,19
<b>BSA – AR+ATO</b>	27,76±0,71

#### 4.1.2 Citotoxicidade do ATO na presença de apo- e holo-transferrina

Procedeu-se com a apo- e a holo-transferrina da mesma forma que para com a BSA. Neste caso a concentração de transferrina estudada foi de 2,60 mg/mL, correspondente à concentração plasmática da proteína. Para o caso da holo-transferrina, adicionou-se Fe<sup>+3</sup> numa proporção de 1 de proteína para 3 de ião para saturar a proteína.

A Figura 4.2 representa o perfil de toxicidade do arsénio na presença de apo- e holo-transferrina. Relativamente à apo-transferrina (sem  $\text{Fe}^{+3}$ ), observa-se que a diminuição da viabilidade celular segue o mesmo comportamento que as células incubadas com o composto em estudo, até à concentração de 5,00  $\mu\text{M}$  de composto. Para concentrações superiores de ATO não se observa uma descida acentuada, mas sim uma estabilização do perfil de toxicidade, obtendo-se um valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $15,38 \pm 0,47 \mu\text{M}$  de ATO (Tabela 4.2). Comparando este valor com o  $\text{IC}_{50}$  das células não incubadas com proteína observa-se um aumento do  $\text{IC}_{50}$  para o dobro, o que indica que a apo-transferrina no meio diminui a toxicidade do ATO. A concentração de apo-transferrina poderá dificultar a chegada do ATO às células, o que explicaria a diminuição do seu efeito tóxico. Por outro lado, a apo-transferrina não possui afinidade para o recetor de transferrina a pH 7,4, o que poderá indicar que o ATO ficou em solução associado à proteína.

Para a holo-transferrina, observa-se que após a introdução de ião  $\text{Fe}^{+3}$  à solução, o perfil de toxicidade torna-se ligeiramente mais acentuado, quando comparando com o controlo. Na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  o perfil da holo-transferrina cruza o do controlo, observando-se uma estabilização do mesmo. A partir de 15,00  $\mu\text{M}$  até ao valor de 20,00  $\mu\text{M}$  de ATO a descida da viabilidade celular volta a acentuar-se até um valor próximo do valor base do ensaio de controlo. O valor de  $\text{IC}_{50}$  deste último ensaio encontra-se na ordem dos  $11,65 \pm 1,59 \mu\text{M}$  de ATO. Esta descida de  $\text{IC}_{50}$  da holo-transferrina, quando comparado com a apo-transferrina, indica maior toxicidade do ATO para com as células, por parte da holo-transferrina.

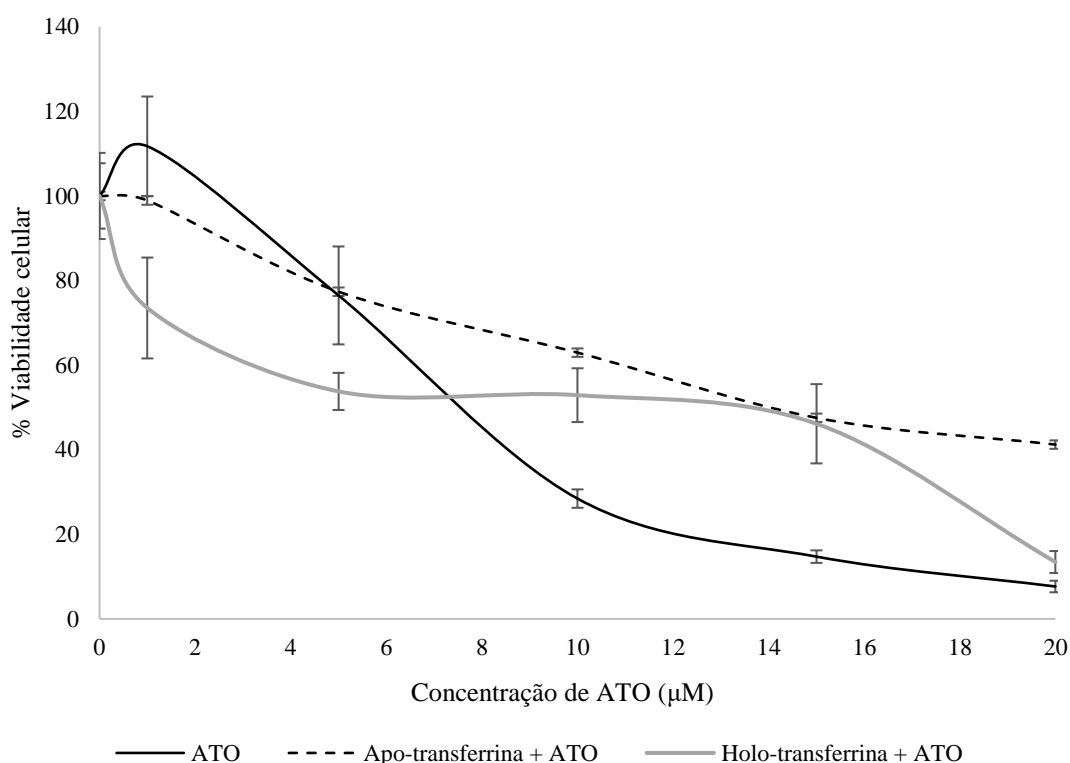


Figura 4.2 Perfil de citotoxicidade obtido pelo ensaio de MTT do composto ATO sobre a linha celular HeLa Kyoto, incubada com 2,60 mg/mL (33,77  $\mu\text{M}$ ) de apo- e holo-transferrina, sobre concentrações crescentes de ATO. As concentrações de ATO estudadas (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) encontram-se apresentadas com os desvios padrão associados (8x2 replicados).

A presença de transferrina parece causar principalmente diminuição da toxicidade do ATO. A holo-transferrina tem sido alvo do estudo de vetorização de compostos com potencial terapêutico anti-cancerígeno. As células cancerígenas apresentam uma sobreexpressão de recetores de transferrina, fato que tem conduzido à procura de novos compostos que possam ser associados à holo-transferrina e incorporados nas células cancerígenas de forma mais seletiva<sup>81</sup>. Um dos exemplos é a conjugação de artemisinina com a holo-transferrina, que se mostrou eficiente na indução de toxicidade contra várias

linhas celulares de tumores não sólidos<sup>82</sup> e da mama<sup>83</sup>, assim como se revelou capaz de induzir apoptose em células do cancro da próstata<sup>84</sup>. Contudo, tal não se verificou com este ensaio. A descida do IC<sub>50</sub> observada poderá indicar que o ATO se associa à holo-transferrina aproximando-se à superfície celular, aumentando a concentração efetiva junto da membrana celular exercendo o seu efeito tóxico.

Tabela 4.2 Valores de IC<sub>50</sub> e respetivos desvios padrão obtidos no ensaio de MTT para as células HeLa após incubação com apo- e holo-transferrina na concentração de 2,60 mg/mL (33,77μM) com os desvios padrão associados (8×2 replicados).

<b>IC<sub>50</sub> para células HeLa (μM)</b>	
<b>ATO</b>	7,69 ± 0,37
<b>Apo-Transferrina ATO</b>	15,38 ± 0,47
<b>Holo-Transferrina+ATO</b>	11,65 ± 1,59

## 4.2 Quantificação da estequiometria da ligação Proteína – ATO

### 4.2.1 Quantificação da ligação BSA – ATO

A estequiometria de ligação BSA-ATO foi quantificada através do protocolo descrito no Capítulo 3.2.3.1.

A BSA é uma proteína de transporte com afinidade para um grande número de compostos. A incubação prévia da proteína com ligandos conhecidos permitiu testar se a afinidade da proteína para com ATO na presença de RA, quercetina e ácido láurico. A associação destes ligandos a diferentes locais de ligação na proteína causam modificações alostéricas da mesma. Estas modificações na proteína poderão expor locais com maior afinidade ao ATO.

Na Tabela 4.3 encontram-se os valores obtidos após a quantificação da estequiometria BSA-ATO, com os complexos BSA-molécula orgânica anteriormente descritos. Observou-se que a BSA se liga a 3,12 moléculas de ATO por cada molécula de BSA. Na presença de BSA-RA a estequiometria aumenta para 5,29 moléculas de ATO por molécula de BSA e na presença de quercetina para 6,40 moléculas por molécula de BSA. Observa-se assim, que a presença destes dois compostos orgânicos associados à albumina aumenta a afinidade da proteína para com o ATO. Este fato poderá ser indicador de que a alteração estrutural que a BSA sofre quando a ligação ao RA e à quercetina conduz ao aumento da afinidade complexo proteína-molécula orgânica para com o ATO. O mesmo não se pode observar relativamente ao ácido láurico, cujos resultados indicam uma diminuição para 1,89 moléculas de ATO por molécula de proteína. Os resultados apresentados resultam da média e desvio padrão de 3 medições. Os valores de desvio padrão poderão indicar que o ATO não se liga sempre ao mesmo local de ligação, podendo estabelecer mais interações com uma molécula proteica que outra.

Tabela 4.3 Valores obtidos da estequiometria da ligação BSA-ATO com os respectivos desvios padrão (3 replicados).

Espécie em incubação com a BSA	Nº moléculas ATO/molécula proteína
ATO	3,12±0,80
RA+ATO	5,29±0,29
Quercetina+ATO	6,40± ,48
Ácido Láurico+ATO	1,89±0,18

Guifeng J. *et al.* determinaram a estequiometria de ligação entre ATO, MMA<sup>III</sup> e DMA<sup>III</sup> e metalotioneínas por ICP-MS obtendo um rácio de ligação de 6 moléculas de ATO para 1 de proteína<sup>40</sup>. Também Toyama, M. *et al.*<sup>85</sup> determinaram que o mesmo rácio por MALDI-TOF-MS, ICP-AES e Uv-visível. Contudo, as metalotioneínas possuem grupos sulfidrilo livres o que permitem a ligação covalente do As<sup>+3</sup> a estes grupos. As pontes dissulfeto resultam da oxidação de grupos sulfidrilo formando ligações covalentes. Na BSA estes grupos não se encontram disponíveis para estabelecer ligações com o ATO.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade a presença de BSA, na concentração plasmática, surte um efeito mais tóxico que o ATO isolado o que poderá indicar a entrega do ATO diretamente à célula. Por outro lado, incubação com BSA-RA na proporção de 1:1 diminui o efeito tóxico do composto em estudo. Cruzando com os resultados da quantificação, a BSA apenas associa-se a 3,12 moléculas de ATO enquanto que com RA a modificação alostérica sofrida pela BSA

aumenta a sua afinidade para o ATO ligando a 5,29 moléculas do composto. Os ensaios de citotoxicidade indicam que a BSA na presença de ATO é mais tóxica que a BSA-RA o que poderá ser interpretado de duas formas: 1) o aumento de afinidade impede a liberação do ATO pela BSA para as células, o que justifica o comportamento o perfil de toxicidade da BSA-RA ou 2) a presença de RA numa concentração de 601,50µM exerce um efeito citoprotector. Como anteriormente referido, o RA tem capacidade de se associar à BSA, causando pequenas alterações estruturais, detetáveis por UV-Visível e fluorescência resultantes da interação BSA-RA<sup>86,87,66</sup>.

Na presença de BSA-quercetina observa-se um aumento da proporção proteína-ligando para 6,40 moléculas de ATO por molécula de BSA, o que indica aumento da afinidade. Estudos de fluorescência indicam que a quercetina se liga à BSA no subdomínio IIA<sup>88</sup>. Esta ligação causa modificação alostérica na proteína, o que suporta a hipótese de que este aumento de afinidade poderá estar associado à exposição de diferentes porções da proteína com maior afinidade para o ATO. Adicionalmente, estudos *in vivo*<sup>89,90</sup> realizados com quercetina indicam que esta terá capacidade de diminuir efeitos tóxicos causados pela intoxicação por ATO. Da mesma forma que o RA diminui a citotoxicidade do ATO poderá especular-se que a quercetina atue da mesma forma. Contudo, nada se pode concluir relativamente ao efeito biológico relativamente à quercetina, *in vitro*.

Contrariamente ao observado anteriormente, o composto em estudo apresenta menor afinidade para com o complexo BSA-Ácido Láurico, ligando-se apenas 1,89 moléculas de ATO por molécula de BSA. O ácido láurico ou ácido dodecanóico, é um ácido gordo saturado com uma cadeia com 12 carbonos. Estudos de ligação revelaram que a BSA possuiu locais de ligação a ácidos gordos com tamanho da cadeia carbonada variável<sup>45,91,92</sup>. Após a ligação de ácidos gordos à BSA, esta sofre modulação alostérica, sofrendo rearranjo estrutural que poderá expor resíduos que se encontram ‘camuflados’ quando a proteína apresenta a sua conformação nativa<sup>48</sup>. A BSA possuiu 7 locais de ligação para ácidos gordos e em caso de saturação a proteína demonstrou ter capacidade de aumentar a sua afinidade para 11 ácidos gordos de cadeia curta ou longa, por molécula de BSA. Uma vez que a BSA possui locais de ligação com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas e os ácidos gordos são moléculas anfífilas, estabelecendo interações eletrostáticas e hidrofóbicas com a proteína poder-se-á considerar que: 1) o ácido láurico saturou a proteína e os seus locais de ligação diminuindo a afinidade dos mesmos para com o ATO ou 2) a modificação alostérica reduz o número locais com afinidade para com o ATO. Nada se pode concluir quanto a citotoxicidade do complexo BSA-ácido láurico, não sendo possível também estabelecer uma relação entre a estequiometria e a toxicidade do composto.

#### 4.2.2 Quantificação da ligação apo- e holo-transferrina– ATO

Procedeu-se da mesma forma para com a apo- e holo-transferrina. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.4. Nesta Tabela, é possível observar que os valores de ligação de ATO encontram-se na ordem de 1 a 2 moléculas de ATO por molécula de apo- e holo-transferrina. A apo-transferrina consegue ligar-se a 1,67 moléculas de ATO e a holo-transferrina liga-se a 1,36 moléculas de ATO. Apesar dos valores médios obtidos serem diferentes, os desvios padrão (indicados na Tabela 4.4) indicam que o número de átomos associado será muito semelhante. Este fato poderá ser indicativo de que a alteração estrutural que a apo-transferrina sofre após a ligação do Fe<sup>+3</sup> não leva ao aumento da afinidade do ATO pela mesma.

Cruzando esta informação com a informação obtida nos ensaios de citotoxicidade, observa-se que o efeito tóxico exercido pela holo-transferrina poderá dever-se ao efeito de proximidade da proteína à membrana plasmática da célula, visto que, tratando-se de uma linha celular cancerígena possui mais recetores expressos para a proteína de transporte, o que poderá aumentar a concentração efetiva do ATO na membrana plasmática. Por outro lado, a associação de 1:1 ou de 1:2 poderá manter ATO ‘longe’ da

membrana celular, impedindo a sua entrada, o que justificaria a diminuição da citotoxicidade do mesmo. Esta justificação vai de encontro ao raciocínio para os ensaios de citotoxicidade justificando o IC<sub>50</sub> mais baixo a holo-transferrina face à apo-transferrina.

Tabela 4.4 Estequiometria apo/holo-transferrina-ATO com os respetivos desvios padrão (3 replicados).

<b>Espécie em incubação com a transferrina</b>	<b>Nº moléculas ATO/molécula proteína</b>
ATO	1,67±0,43
Fe <sup>+3</sup> +ATO	1,36±0,50

### 4.3 Análise Estrutural de Proteínas

Para a análise do efeito de ATO e RA sobre a BSA assim como do arsénio e  $\text{Fe}^{+3}$  sobre a transferrina, recorreram-se a métodos espectrofotométricos como a absorção no UV-visível<sup>40,72</sup>, fluorescência<sup>87,93</sup> e FTIR<sup>67,94,95</sup>.

#### 4.3.1 BSA

##### 4.3.1.1 Absorção UV-visível

A absorção de radiação no UV-Visível é muito utilizada para avaliar variações no comportamento de absorção de radiação de proteínas, associado a alterações na estrutura das mesmas. Os aminoácidos aromáticos como o triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e com menor contribuição da fenilalanina (Phe) contribuem para a absorção a comprimentos de onda compreendidos entre 250 a 300 nm. Os triptofanos e as tirosinas são responsáveis pela absorção de radiação a 280 nm. As fenilalaninas absorvem próximos dos 260 nm, mas com menor intensidade que os Trp e Tyr. As cisteínas (Cys) possuem grupos sulfidrilo que absorvem entre 250-260 nm também com uma intensidade bastante inferior quando comparado com os aminoácidos aromáticos<sup>96</sup>.

Numa primeira abordagem avaliou-se o comportamento da BSA na presença de ATO. Avaliou-se a absorvência da BSA, na concentração de 0,40 mg/mL (6,02  $\mu\text{M}$ ) e o efeito de concentrações crescentes de ATO. A absorvência da amostra foi avaliada entre 250-340 nm, com o máximo de absorção a 280 nm. Pela Figura 4.3 pode-se observar um aumento da absorvência da amostra após adição de ATO. A absorvência de uma amostra proteica relaciona-se diretamente com a concentração de proteína existente no meio, como se pode observar pela Equação 4.1, que define a Lei de Beer-Lambert<sup>98</sup>:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad [\text{Eq. 4.1}],$$

sendo  $A$  a absorvência da amostra,  $\varepsilon$  o coeficiente de extinção molar,  $l$  a largura da cuvette e  $c$  a concentração da amostra. Assim a variação da absorvência poderá estar diretamente relacionada com a concentração na amostra. A realização dos ensaios em triplicado elimina o efeito de erros experimentais. Também não se observam *blue shifts* que poderão estar associados à alteração da conformação da proteína ‘protegendo’ mais os aminoácidos aromáticos deslocando o comprimento de onda de absorção para valores mais baixos. Não se observam *red shifts* que poderiam estar associados à desnaturação da proteína. Estes resultados indicam uma alteração da estrutura terciária por ligação do ATO à BSA apesar destas variações não serem proporcionais à concentração de ATO no meio<sup>94</sup>.

Na Figura 4.4 encontram-se apresentados os valores de absorvência a 280 nm podendo observar-se que perante as concentrações crescentes de ATO há um aumento da absorvência da BSA para valores de absorvência ligeiramente superiores. Esta observação indica que ocorrem pequenas alterações na estrutura da proteína. Uma vez que não se observa um aumento na absorvência proporcional à concentração introduzida, não se pode afirmar que o ATO se associe à BSA num local específico.



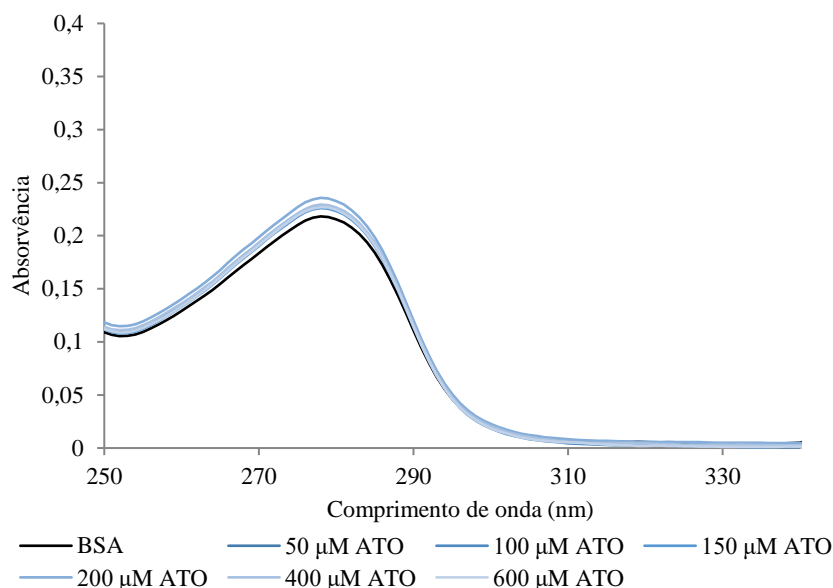


Figura 4.3 Espectros de Uv-Visível de 0,40 mg/mL (6,02 µM) de BSA com concentrações crescentes de ATO

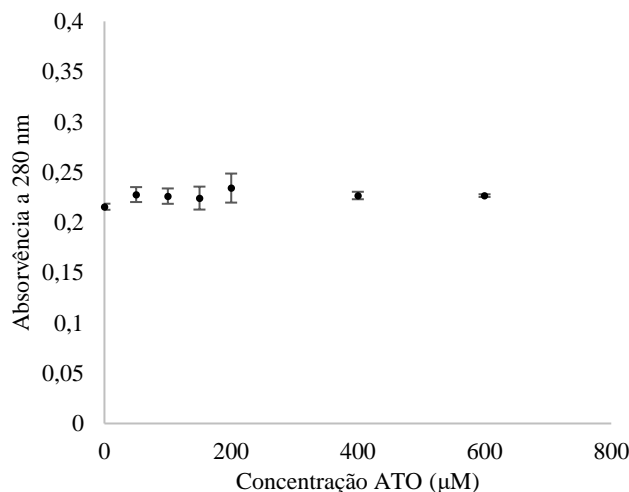


Figura 4.4 Absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de UV-Visível de 0,40 mg/mL (6,02 µM) de BSA com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).

#### 4.3.1.2 Quantificação protéica

Nos ensaios anteriores observaram-se variações de absorvência que poderiam estar associadas à precipitação da proteína. Utilizou-se o Método de Bradford com algumas alterações, para observar se a proteína precipita. Como anteriormente referido, a absorvência é dependente da concentração da mesma na amostra, de acordo com a Lei de Beer-Lambert. Assim, a diminuição da absorvência observada poderá estar associada ao *salting out* da proteína por excesso de compostos iónicos no meio<sup>98</sup>. Para tal, utilizou-se o método de Bradford para realizar a quantificação da proteína em solução. Partindo do princípio que a proteína insolúvel precipita, a quantificação pelo Método de Bradford será suficiente para concluir se após a incubação a quantidade de BSA em solução será ou não a mesma.

A proteína insolúvel que teria causado a diminuição da absorvência pelos resultados de Uv-visível não reagirá com o Azul de Coomassie, pois terá precipitado para o fundo do *eppendorf* onde a solução foi incubada. Os resultados da quantificação encontram-se apresentados na Tabela 4.5. Como

se pode observar a proteína não precipitou, mantendo-se a concentração da mesma em valores muito próximos, consoante a concentração de ATO com o qual a proteína foi incubada. A concentrações muito elevadas de ATO, muito superiores às estudadas por absorção de UV-visível não há alteração na concentração proteica em solução o que indica que a proteína ressolubilizou. Este resultado suporta a hipótese de que a proteína não precipita na presença de ATO.

Tabela 4.5 Quantificação de BSA em solução pelo método de Bradford com os desvios padrão associados (3 replicados ).

Concentração de ATO ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	$11.68 \pm 1.36$
50	$10.54 \pm 0.68$
200	$10.87 \pm 0.44$
800	$11.11 \pm 0.47$

#### 4.3.1.3 Fluorescência

A espectrometria de fluorescência, aplicada à análise de proteínas é bastante útil para avaliação da ligação proteína ligando. A fluorescência de proteínas deve-se à presença de triptofanos que, por possuírem um grupo índole, atuam como fluoróforos. Estes, sob a ação de radiação libertam fótons emitindo fluorescência. Assim, proteínas que possuem triptofanos atuam como fluoróforos naturais<sup>50</sup>.

A ligação de compostos orgânicos ou não a estes fluoróforos, assim como a alteração do ambiente químico sentido por estes, deslocaliza os eletrões do sistema de duplas conjugadas, o que diminui a fluorescência total da amostra, posteriormente à ligação dos mesmos. Estes grupos atuam como *quencher* por causarem diminuição da fluorescência. Para o caso particular da BSA, a fluorescência da amostra proteica deve-se à presença de triptofanos, como Trp-134 e Trp-212, que se localizam nos subdomínios IA e IIA<sup>86,99</sup>, respetivamente. Os espetros de excitação e emissão do ATO e da BSA, obtidos com o comprimento de onda de excitação de 280 nm retirados para a concentração de 0,4 mg/mL (6,02 $\mu\text{M}$ ) de BSA e 100  $\mu\text{M}$  de ATO encontram-se no Anexo 7.2 e 7.3, respetivamente. A partir destes observa-se que a BSA apresenta um comprimento de onda máximo de emissão próximo dos 350nm. O ATO apresenta um comprimento de onda de emissão a 310 nm. O estudo de fluorescência da BSA baseou-se na deteção da radiação emitida pelos triptofanos na presença de duas concentrações de ATO. A Figura 4.5 representa o espetro de fluorescência da BSA na concentração de 0,40 mg/mL, na presença de concentrações de 167,67  $\mu\text{M}$  e 333,33  $\mu\text{M}$  de ATO. Como se pode observar os valores de intensidade de emissão de fluorescência não se alteram.

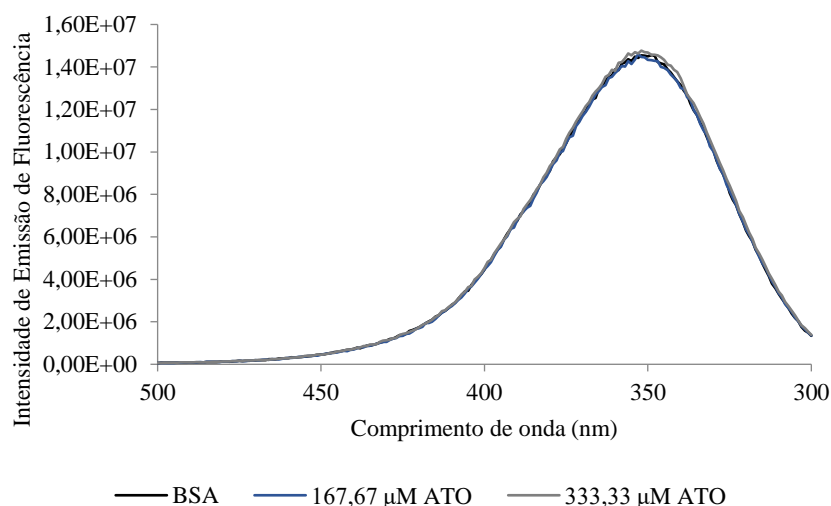


Figura 4.5 Espectro de emissão de fluorescência da BSA na concentração de 0,40 mg/mL (6,02  $\mu$ M) na presença de 167,67 e 333,3  $\mu$ M de ATO.

Como anteriormente referido, a fluorescência de uma amostra proteica altera-se pelo efeito de *quenching* que o ligando exerce sobre a proteína. A ligação de um composto, iónico ou não, ao grupo índole de triptofanos, causa diminuição da fluorescência do mesmo<sup>100</sup>. Por outro lado, a alteração do ambiente químico deste grupo, por alteração alostérica da BSA poderá ter o mesmo efeito de *quenching*. Neste ensaio não se observa alteração da fluorescência da amostra o que indica que a estrutura da proteína não se altera, pelo menos de forma a alterar a capacidade de fluorescência do grupo índole ou por ligação direta do ATO os grupos indole. Por fluorescência também não é possível observar *red shifts* nem *blue shifts* associados à alteração do ambiente químico associado aos triptofanos. Os *blue shifts* resultam do deslocamento do comprimento máximo de absorção para valores inferiores, o que indica que os triptofanos poderão encontrar-se mais protegidos no interior da proteína. Os *red shifts* resultam do deslocamento do valor de absorção máxima para comprimentos de onda maiores podendo estar associados à desnaturação da proteína<sup>93</sup>. Não se observam alterações na fluorescência o que indica que o local de ligação do ATO não influencia a capacidade de fluorescência dos triptofanos.

#### 4.3.1.4 FT-IR

A análise da estrutura secundária de proteínas para avaliar estruturas em hélice- $\alpha$ , folhas plissadas- $\beta$  paralelas e antiparalelas, *random coil* e  $\beta$ -turns é realizada muitas vezes por espectroscopia de FT-IR. A interação da radiação infra-vermelha com a ligação peptídica entre aminoácidos em proteínas causa movimentos vibracionais nas ligações químicas o que por sua vez causa alterações da absorvência observadas no espectro de infra-vermelhos. A análise de proteínas por FT-IR, baseia-se nos modos de vibração da ligação peptídica (R-C(O)-NH-R) que dá origem a quatro bandas, Amida I-IV, no espectro de infra-vermelhos.

A banda espectral da Amida I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) resulta maioritariamente da frequência de alongamento da ligação C=O, sendo que as outras resultam de frequências de vibração e deformação da ligação C-N e C-H. Com o intuito de avaliar a integridade da estrutura secundária da BSA, do ponto de vista estrutural, realizou-se a análise da proteína por espectroscopia de FT-IR. Optou-se pela preparação de amostras em D<sub>2</sub>O. A deuteração de amostras afeta maioritariamente a banda da Amida II, por esta resultar das frequências de dobra da ligação N-H assim, a troca de hidrogénio por deutério irá influenciar a vibração desta ligação levando à diminuição da sua intensidade. No entanto não afeta a banda da Amida I como acontece com a água<sup>74,101</sup>.

A BSA é constituída essencialmente por hélices  $\alpha$ <sup>102</sup>, quando associada a outros compostos, pode sofrer alterações estruturais, que poderão resultar no aumento de folhas plissadas  $\beta$ <sup>78,102</sup>.

No protocolo experimental aplicado estudou-se a concentração de 32,00 mg/mL (481,20  $\mu\text{M}$ ) de BSA. As proporções de ATO encontram-se relacionadas com os ensaios da quantificação da estequiometria de ligação BSA-ATO, estudando-se assim as proporções de 3, 5 e 10 de ATO (correspondentes às concentrações de 1254,60  $\mu\text{M}$ , 2091,00  $\mu\text{M}$  e 4155,88  $\mu\text{M}$ , respetivamente) relativamente à BSA. Como anteriormente referido a banda da Amida I fornece informação estrutural acerca da estrutura secundária de proteínas, como apresentado na Tabela 3.1. Neste estudo não se observaram variações na banda da Amida I. A segunda derivada do espectro da Amida I permite observar os máximos e mínimos da função fornecendo informação mais detalhada sobre a mesma. Assim, procedeu-se à segunda derivada de Norris-Williams. Para efeitos de confirmação de que não ocorreram alterações na estrutura secundária calcularam-se razões de absorvência entre os comprimentos de onda de  $1635\text{ cm}^{-1}$  e  $1652\text{ cm}^{-1}$  correspondentes aos números de onda em que se encontram as folhas plissadas- $\beta$  e hélices- $\alpha$ , respetivamente.

A Figura 4.6 (A) representa o espectro da Amida I da BSA e da segunda derivada desse mesmo espectro (B). O espectro da banda da Amida I indica uma diminuição da absorvência ao número de onda de  $1648\text{ cm}^{-1}$  na presença da proporção BSA 1:5 de ATO. Para o espectro da proteína observa-se um pico máximo da banda da Amida I a  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Nas proporções de 1:3 e 1:10 de ATO observam-se pequenas variações a  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Estes números de onda encontram-se associados a hélices- $\alpha$ .

No gráfico da segunda derivada o ponto máximo encontra-se a  $1652\text{ cm}^{-1}$ , o que diz respeito a estruturas em hélice- $\alpha$ . Relativamente ao controlo, observa-se um ligeiro aumento a  $1652\text{ cm}^{-1}$  para a proporção 1:3 de ATO e um aumento mais pronunciado para a proporção de 1:10, no mesmo número de onda, contudo este último espectro apresenta um aumento proporcional a outros números de onda referentes a outras estruturas ( $\beta$ -turns e *random coil*). As razões entre os comprimentos de onda respetivos a absorvência das folhas plissadas- $\beta$ /hélices- $\alpha$  foram calculadas e encontram-se apresentadas na Figura 4.7.

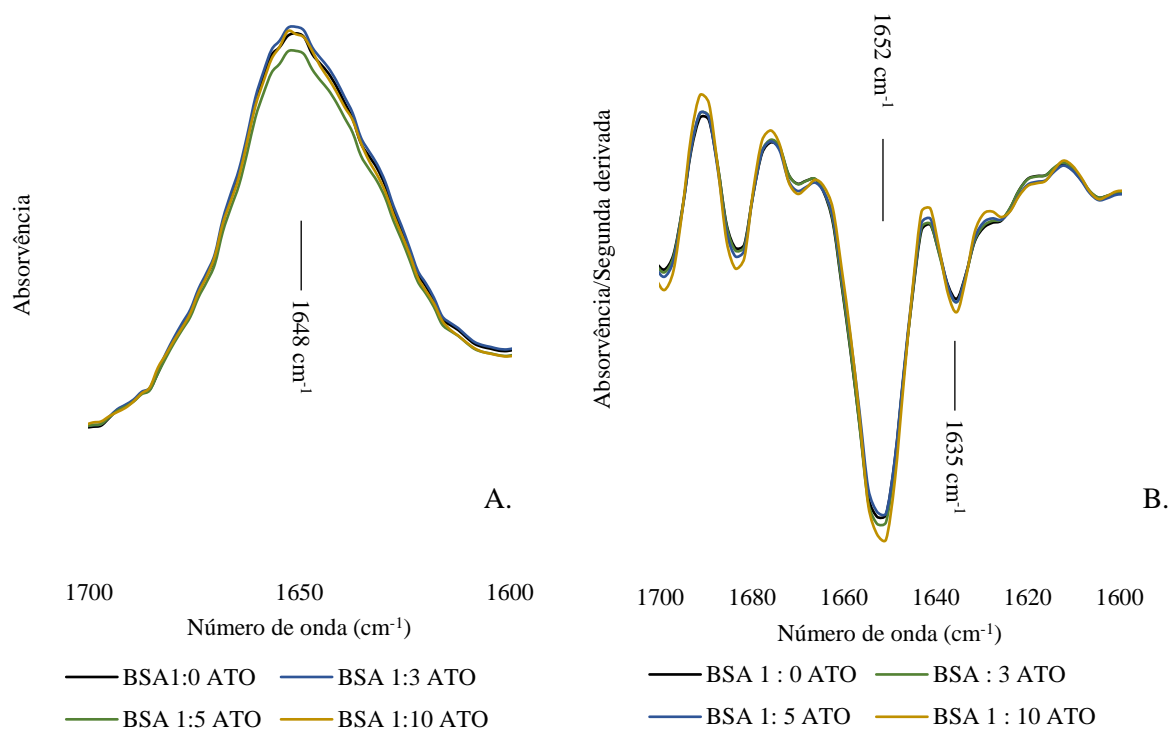


Figura 4.6 Espectros de FT-IR da BSA na concentração de 32,00 mg/mL (481,20 $\mu$ M), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

A Figura 4.7 indica uma ligeira subida das razões  $\beta/\alpha$  que está associada à diminuição das hélices- $\alpha$ , mais acentuada na proporção 1:10. Contudo estes resultados não podem ser associados à perda de elementos da estrutura secundária uma vez que se tratam de variações mínimas da segunda derivada da Amida I.

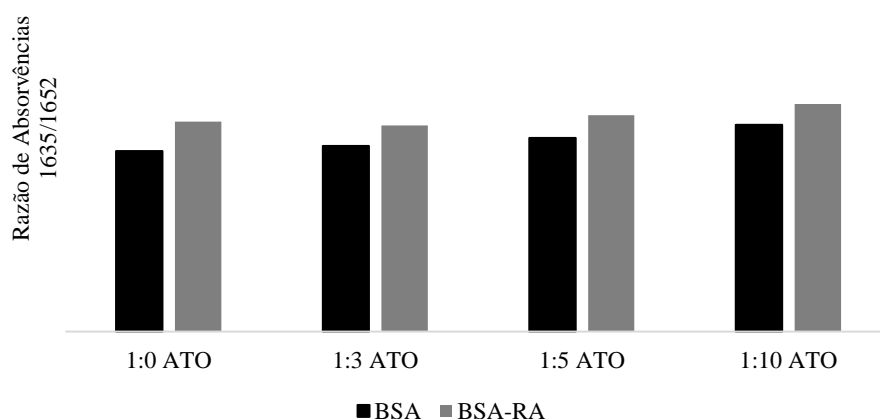


Figura 4.7 Razões de absorvência entre os números de onda 1635/1652  $\text{cm}^{-1}$  obtidas pelos valores dos números de onda da segunda derivada.

Pela observação da Figura 4.6 (B) não se verifica aparecimento de nenhuma banda nos comprimentos de onda correspondentes às folhas plissadas- $\beta$  o que indica que não se formaram mais estruturas em folhas plissadas- $\beta$ .

Avaliou-se também a alteração da estrutura secundária na presença de RA. Como forma de averiguar se alguma alteração ocorreu após ligação de RA procedeu-se da mesma forma para com a BSA-RA. Os espectros de FT-IR encontram-se apresentados na Figura 4.8. Como se pode observar não ocorrem alterações na banda da Amida I (Figura 4.8 A). Observa-se o aparecimento de um sulco, no espectro segunda derivada da banda da Amida I a  $1652\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4.8 B) contudo, esse aumento aparenta ser proporcional aos números de onda dos restantes motivos de estrutura secundária. A razão  $1635/1650$  no gráfico da Figura 4.7 indica que a maior variação ocorre efetivamente após ligação do RA.

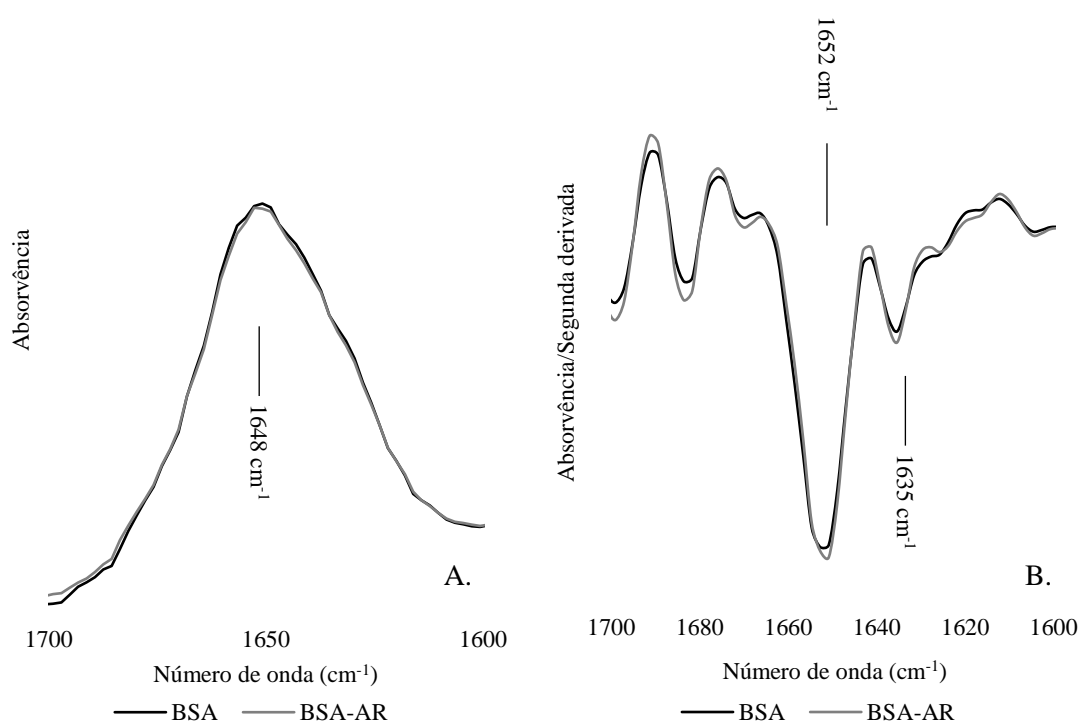


Figura 4.8 Espetros de FT-IR da BSA-RA na concentração de  $32,00\text{ mg/mL}$  ( $481,20\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

Trabalhos anteriores, descritos na literatura indicam que o RA se associa tanto à HSA<sup>67</sup> como à BSA<sup>78</sup>, causando alterações mais pronunciadas na estrutura secundária, que as observadas. Contudo, nestes trabalhos o protocolo experimental desenvolvido não é referente a amostras em estado aquoso ou as concentrações de RA com que as albuminas foram incubadas são muito superiores às utilizadas neste trabalho experimental. Neste estudo observou-se que a incubação de BSA na proporção de 1:1 com RA não altera a banda da amida I de tal forma que se possa afirmar que ocorram alterações na estrutura secundária.

Complexos BSA-RA foram incubados com as mesmas proporções de ATO que o ensaio anteriormente referido. Os espectros encontram-se representados na Figura 4.9. O espectro do complexo proteína-RA incubado com ATO também não sofre grandes alterações quando comparado com o espectro do controlo para as três proporções estudadas. Apenas se observa uma diminuição na intensidade de

absorvência da Amida I para a proporção 1:5 (Figura 4.9 A). Observa-se também que o sulco no gráfico da Figura 4.8 B associado à ligação do RA à BSA também está presente no gráfico da segunda derivada (Figura 4.9 B), mantendo-se a alteração causada pela ligação do RA. Tal fato indica o ATO não afeta a ligação do RA à BSA. Os raios 1635/1650 indicam um aumento da razão  $\beta/\alpha$  para as proporções 1:5 e 1:10 relativamente complexo BSA-RA incubado com 1:0 de ATO, o que indica que as maiores alterações na estrutura secundária ocorrem para as concentrações mais elevadas de ATO.

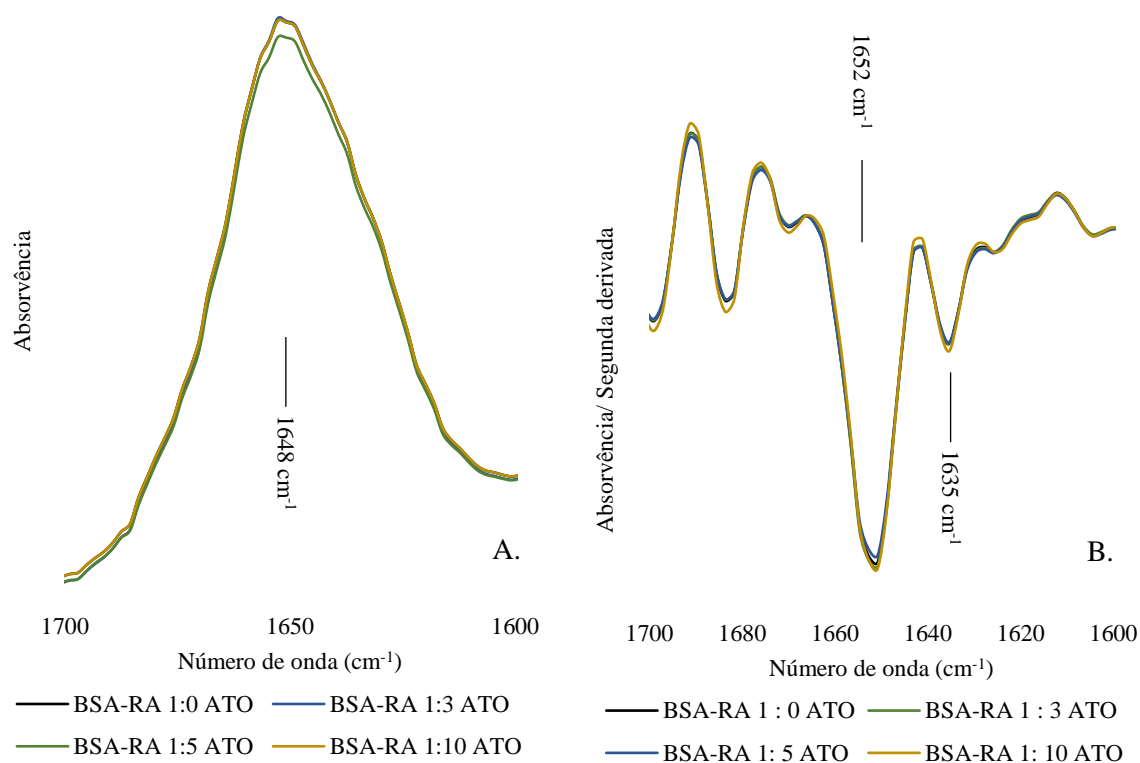


Figura 4.9 Espetros de FT-IR da BSA-RA na concentração de 32,00 mg/mL (481,20 $\mu$ M), após incubação com as proporções de 1:3; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

Apesar de se observarem pequenas alterações associadas à alteração de motivos da estrutura secundária, a BSA não sofre alterações relevantes no que diz respeito à alteração destes motivos. Da mesma forma também se observa que o complexo BSA-RA não sofre alterações relevantes após incubação com ATO.

## 4.3.2 Transferrina

### 4.3.2.1 Absorção no UV-visível

Procedeu-se à avaliação da absorção de radiação UV-visível, pela apo-transferrina (Figura 4.10 A) e pela holo-transferrina (Fig. 4.10 B).

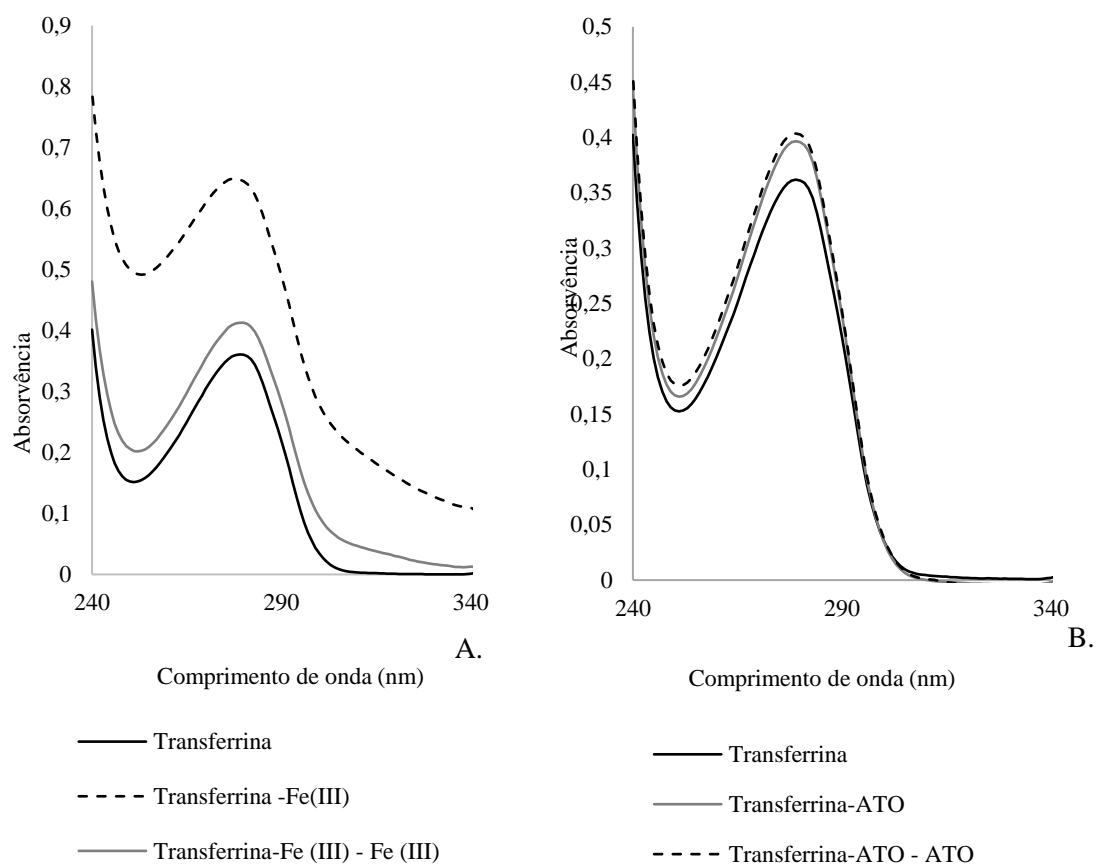


Figura 4.10 Espectros de Uv-visível da apo-transferrina na concentração de 0,40 mg/mL (5,20 $\mu$ M), incubados com de 100  $\mu$ M de Fe<sup>+3</sup> (A) e de 100  $\mu$ M de ATO (B).

Observa-se que a holo-transferrina tem um perfil de absorção ligeiramente diferente da apo-transferrina que se caracteriza pelo aumento ligeiro da absorvência e pelo aparecimento de um ombro entre os 300-340 nm que provém das alterações estruturais sofridas pela proteína após a ligação do seu ligante específico<sup>103</sup> (Figura 4.10 A). O Fe<sup>+3</sup> causa uma alteração estrutural na apo-transferrina, que leva à alteração do seu espectro de absorção. Esta poderá também expor outros resíduos de aminoácidos como cisteínas ficando estas mais expostas à radiação incidente, o que causa um aumento de absorvência das mesmas, como se verifica no intervalo entre 250-260 nm. A Figura 4.11 B representa o espectro da apo-transferrina na presença de 100 $\mu$ M de ATO.

A Figura 4.11 representa o espectro de absorção da apo-transferrina na presença de concentrações de 50,00; 100,00; 150,00; 200,00; 300,00; 400,00 e 600,00  $\mu$ M de ATO. Também para estes espectros se subtraiu a absorvência das respetivas concentrações do ião. Todas as outras concentrações levaram a um aumento da absorvência da holo-transferrina, com exceção da concentração de 200  $\mu$ M que levou a uma diminuição ligeira da absorvência da proteína em solução. Contudo, não se verifica uma relação linear entre a quantidade de composto adicionado à solução e a absorvência da proteína. O comportamento da absorção da apo-transferrina assemelha-se ao da BSA.



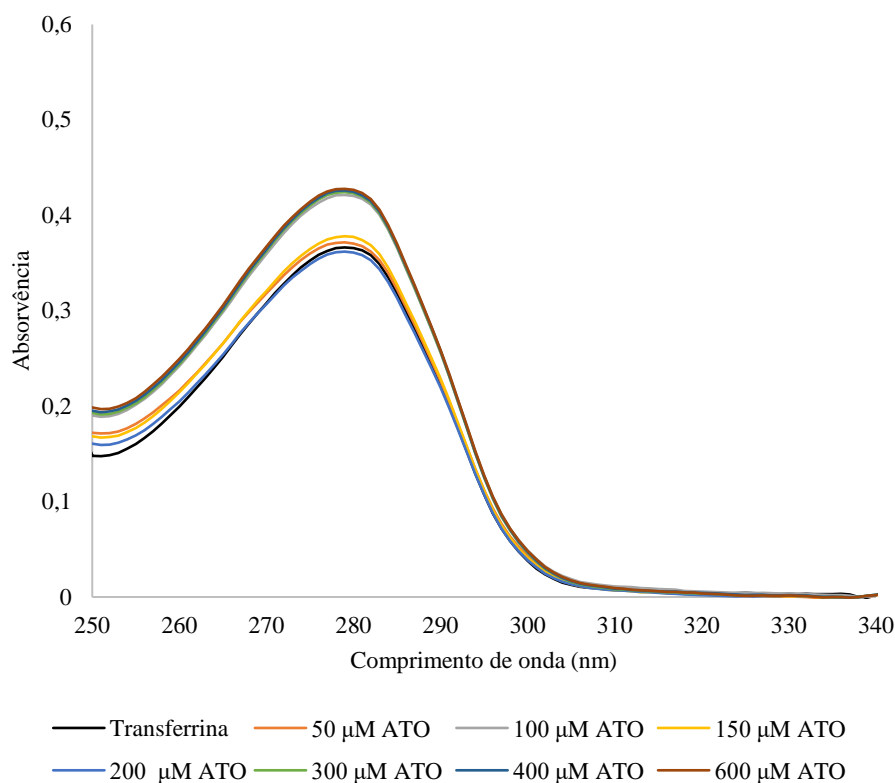


Figura 4.11 Espectros da apo-transferrina na concentração de 0,40mg/mL (5,20µM) incubada com concentrações crescentes de ATO.

O gráfico representado pela Figura 4.12, representa os valores de absorvência da amostra em questão a 280 nm. Após observação do gráfico torna-se claro que concentrações crescentes de composto poderão levar a uma alteração da estrutura terciária da proteína que se revela num aumento da sua absorvência. O ATO poderá associar-se à proteína em locais não específicos causando alterações da estrutura terciária, que afetem a capacidade de absorção de resíduos de aminoácidos.

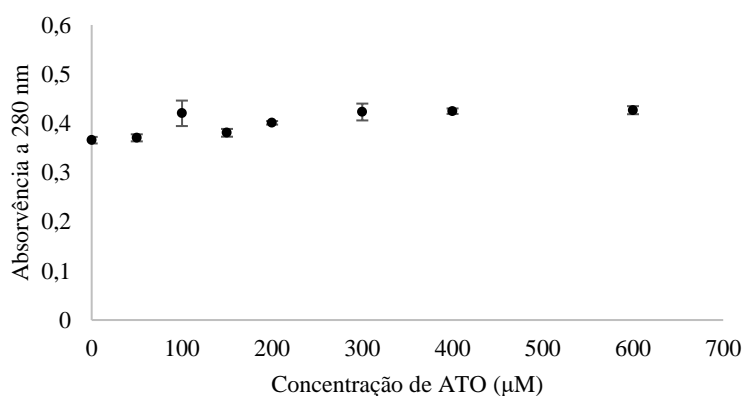


Figura 4.12 Valores de absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de UV-Visível de 0,40 mg/mL (5,20µM) de apo-transferrina com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados)..

Seguidamente, observou-se o comportamento da absorvência da holo-transferrina. Para tal, incubou-se a proteína com 100 µM de  $\text{Fe}^{+3}$  e adicionaram-se concentrações crescentes de ATO. Assim como para os ensaios anteriores, também o espectro da solução iônica (com ATO e  $\text{Fe}^{+3}$ ) foi subtraído ao espectro do complexo. A Figura 4.13 representa o espectro do ensaio referido. Também neste último espectro observa-se que a absorvência não aumenta linearmente com a concentração de ião adicionada à amostra.

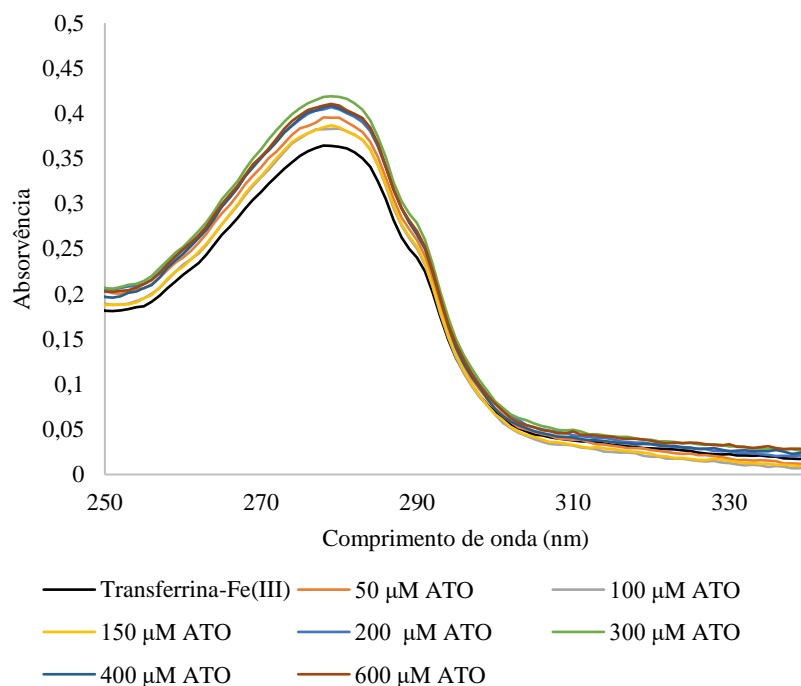


Figura 4.13 Espectros da holo-transferrina, na concentração de 0,40 mg/mL (5,20  $\mu$ M) após a adição de concentrações crescentes de ATO.

O gráfico representado na Figura 4.14 representa a variação da absorvência da proteína a 280 nm. Por comparação dos espectros da holo- e da apo-transferrina na presença de concentrações crescentes de ATO, é possível afirmar que a introdução de arsénio à solução leva a um aumento de absorvência da proteína, quando comparado com o controlo, da mesma forma que atua sobre a apo-transferrina. Esta variação poderá estar associada a alterações estruturais sofridas pela holo-transferrina após incubação com o composto.

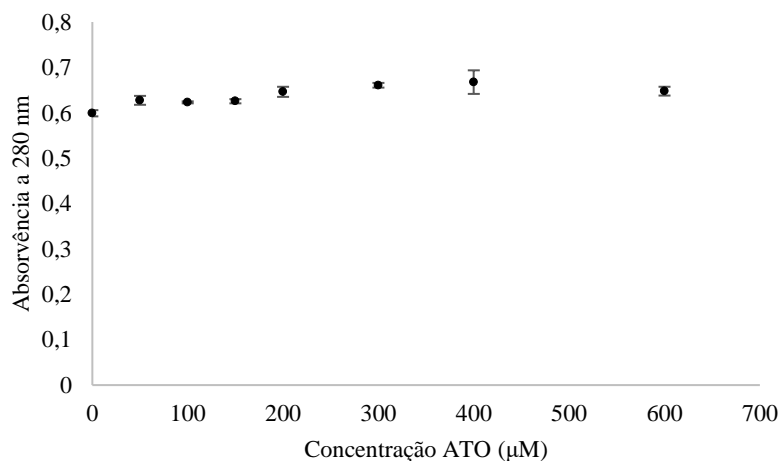


Figura 4.14 Absorvência a 280 nm obtidos pela técnica de Uv-Visível de 0,40 mg/mL (5,20  $\mu$ M) de holo-transferrina com concentrações crescentes de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).

A partir das Figuras 4.12 e 4.14 é possível observar que as absorvências da apo-transferrina variam bastante mais que quando comparado com os valores de absorvência a 280 nm da holo-transferrina. Esta evidência poderá estar relacionada com a rigidez da própria proteína. Na ausência de  $\text{Fe}^{+3}$ , a apo-transferrina tem uma conformação mais flexível que após a ligação com o catião trivalente, visto que o  $\text{Fe}^{+3}$  tem a capacidade de estabilizar a transferrina.

#### 4.3.2.2 Quantificação Protéica

Como forma de confirmação de que os valores de absorvência da apo- e da holo-transferrina não se tratam de variações na concentração devido à precipitação de proteína o Método de Bradford foi utilizado para averiguar se a apo-transferrina sofre *salting out* após a adição de ATO. Da mesma forma que os resultados obtidos para a BSA poderiam ser explicados pela precipitação da proteína, também os resultados obtidos por UV-visível da apo-transferrina indicam que a concentração de proteína poderá diminuir conduzindo aos resultados obtidos a 280 nm, apresentados na Figura 4.15. A Tabela 4.6 permite observar que, apesar do aumento de concentração do composto as concentrações de proteína permanecem semelhantes, o que indica que a apo-transferrina não precipita na presença de ATO. Tendo em conta o protocolo experimental realizado se a proteína em solução precipitasse no *eppendorf* observa-se-ia uma diminuição da absorvência da amostra. Como não se observam grandes desvios concluiu-se que a proteína não precipita sob concentrações elevadas de ATO. Os resultados obtidos para a holo-transferrina, não possuem os mesmos desvios que os obtidos para a apo-transferrina, daí não ter sido necessário realizar o Método de Bradford para a quantificação protéica na presença de  $\text{Fe}^{+3}$  e ATO.

Tabela 4.6 Resultados do Método de Bradford para a transferrina na presença de concentrações de ATO com os desvios padrão associados (3 replicados).

Concentração de ATO ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de Apo-Transferrina ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	$4,31 \pm 0,40$
100	$4,33 \pm 0,20$
400	$4,86 \pm 0,11$
600	$4,60 \pm 0,35$

#### 4.3.2.3 Fluorescência

A fluorescência da apo-transferrina foi estudada. Para tal, estudou-se a concentração de 0,4 mg/mL (5,20  $\mu\text{M}$ ) de apo-transferrina e adicionaram-se concentrações de  $\text{Fe}^{+3}$  de 167,67 e 333,33  $\mu\text{M}$  e a concentração de 333,33  $\mu\text{M}$  de ATO. Os espectros de absorção e emissão encontram-se em Anexo 7.3, 7.4 e 7.5.

Os resultados encontram-se apresentados na Figura 4.15. O  $\text{Fe}^{+3}$  é o ligante específico da transferrina exercendo um efeito de *quencher* que diminui a fluorescência da amostra após a ligação à apo-transferrina<sup>73</sup>. Pelos resultados obtidos, observa-se que o  $\text{Fe}^{+3}$  liga-se à apo-transferrina, induzindo o *quenching* da fluorescência dos triptofanos. Seguindo o mesmo raciocínio, a adição de uma concentração de 333,33  $\mu\text{M}$  de ATO, não causa uma diminuição acentuada da fluorescência, o que indica que o local de ligação entre ATO e apo-transferrina não seja perto de um resíduo de triptofano ou que não ocorre nenhuma alteração conformacional na proteína que afete a capacidade de fluorescência do mesmo.

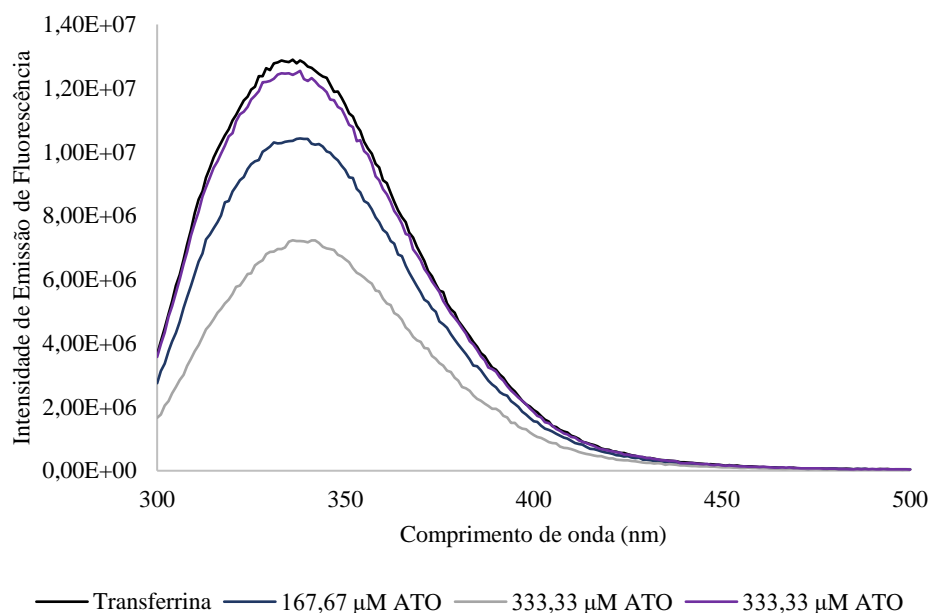


Figura 4.15 Espectros de fluorescência (emissão) obtidos com o comprimento de onda de excitação de 280 nm, para a transferrina na presença das concentrações indicadas de ATO e  $\text{Fe}^{+3}$

#### 4.3.2.4 FT-IR

Para a análise por espectroscopia FT-IR não se procedeu utilizando concentrações elevadas de ATO como para a fluorescência e para absorção de radiação UV-visível, optando-se por proporções diretamente relacionadas com os resultados obtidos após a quantificação da estequiometria de ATO-proteína, testando-se soluções previamente preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  nas proporções de apo-transferrina 1 para 2, 5 e 10 que dizem respeito às concentrações de 830,36  $\mu\text{M}$ , 2077,90  $\mu\text{M}$  e 4155,80  $\mu\text{M}$  de ATO, respetivamente.

A apo- e holo-transferrina são constituídas maioritariamente por hélices- $\alpha$  (54%), por folhas plissadas- $\beta$  (23%) e por  $\beta$ -turns (10 %). Estas proporções não se alteram apesar após a ligação do  $\text{Fe}^{+3}$ , como descrito na literatura<sup>94</sup>.

A Figura 4.16 A representa a banda da Amida I da apo-transferrina. Nesta, não se alterações nos motivos estruturais após a incubação com ATO, apenas na intensidade do sinal. O espectro da segunda derivada da amida I (Figura 4.16 B) apresenta dois máximos, um a 1650  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às hélices- $\alpha$  e outro a 1635  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às folhas- $\beta$ . Neste espectro, observa-se um aumento da intensidade nos números de onda atrás referidos para as proporções 2, 5 e 10 de ATO. Os resultados obtidos da razão  $\beta/\alpha$ , apresentados na Figura 4.17 indicam que, contrariamente ao observado na Figura 4.16 B a proporção 1:5 é onde se verificaram a maior variação da razão, o que indica que sofre alterações mais pronunciadas.

O espectro da Amida I da apo- e da holo-transferrina (Figura 4.18 A) não revela alterações estruturais pronunciadas. Após a ligação do  $\text{Fe}^{+3}$  observa-se também um aumento da intensidade a 1650 e a 1635  $\text{cm}^{-1}$ , no espectro da segunda deriva (Figura 4.18 B). Contudo, a razão  $\beta/\alpha$  apresentada na Figura 4.17 demonstra uma ligeira diminuição do mesmo, quando comparada com a razão obtida para a apo-transferrina. De acordo com a bibliografia não se observam alterações estruturais após ligação do catião trivalente, no que diz respeito à variação do número de estruturas em hélice  $\alpha$  e folhas plissadas- $\beta$ <sup>94</sup>.

A Figura 4.19 A representa os espectros da Amida I da holo-transferrina. Também nestes não se observam alterações na forma da banda da Amida I. No espectro da segunda derivada da Amida I (Figura 4.19 B) podem observar-se pequenas alterações aos números de onda de 1650 $\text{cm}^{-1}$  e 1635  $\text{cm}^{-1}$ . O aumento do sinal observado após incubação da apo-transferrina com  $\text{Fe}^{+3}$  mantém-se nos espectros da

segunda derivada (Figura 4.19 B). As razões obtidas entre os números de onda 1635/1650  $\text{cm}^{-1}$  indicam uma diminuição nesta razão para a proporção 1:2 e um ligeiro aumento para a proporção 1:10. Para a proporção de holo-transferrina 1:5 de ATO, o valor da razão  $\beta/\alpha$  mantém-se (Figura 4.17).

Neste trabalho experimental não se observam variações na banda da Amida I, que estão muitas vezes associadas a modificações de estrutura secundária. Por exemplo, o aparecimento de uma banda mais intensa após adição de composto a proteína num número de onda compreendido entre 1615-1638  $\text{cm}^{-1}$  estará associado ao aumento das estruturas em folhas plissadas- $\beta$ , por exemplo, e como consequência haverá uma diminuição dos números de onda associados a outros motivos estruturais. A ligação do  $\text{Fe}^{+3}$ , como seria de esperar não conduz a alterações acentuadas nos motivos estruturais. A ligação do ATO à apo- e à holo-transferrina causa flutuações nos números de onda de 1650  $\text{cm}^{-1}$  e 1635  $\text{cm}^{-1}$  não indicativas de alterações estruturais associadas à perda de função da proteína.

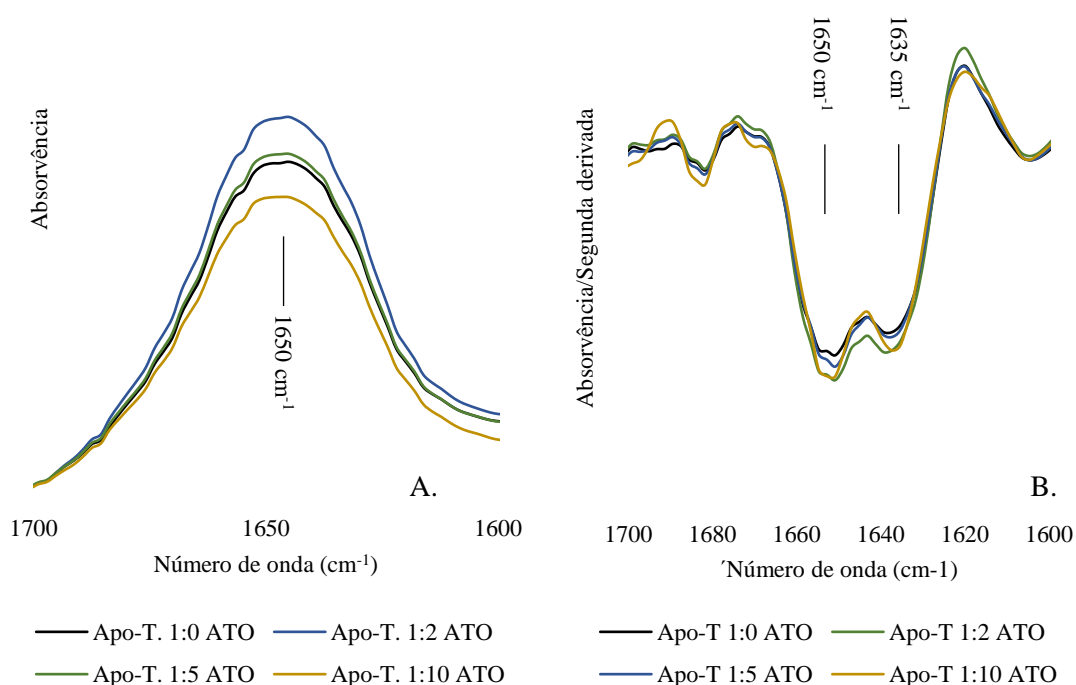


Figura 4.16 Espectros de FT-IR apo-transferrina (Apo-T.) na concentração de 32,00 mg/mL (415,58  $\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

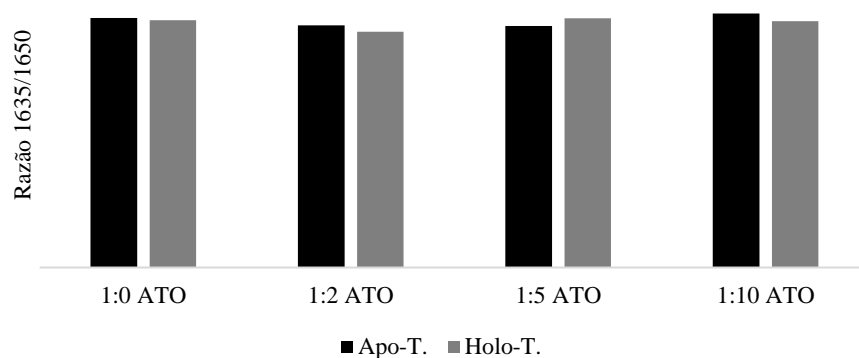


Figura 4.17 Razão entre folhas  $\beta$ / hélices  $\alpha$  referentes à apo-transferrina (Apo-T.) e da holo-transferrina (Holo-T.) obtidas pelos valores dos números de onda da segunda derivada.

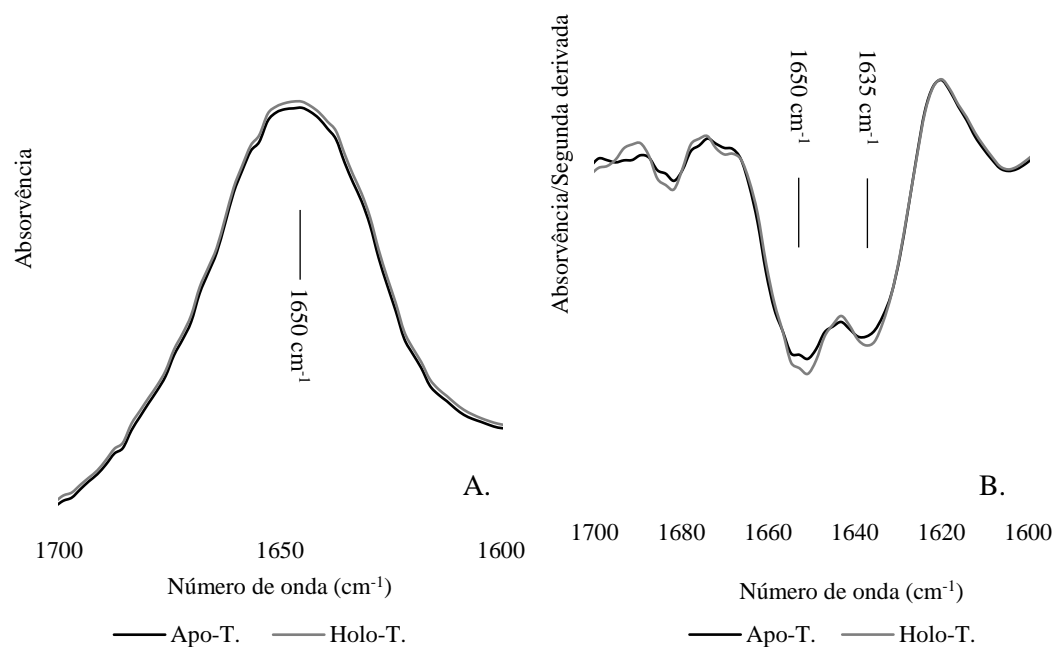


Figura 4.18 Espectros de FT-IR Apo-transferrina (Apo-T.) e da holo-transferrina (Holo-T.) na concentração de 32,00mg/mL (415,58 $\mu$ M), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

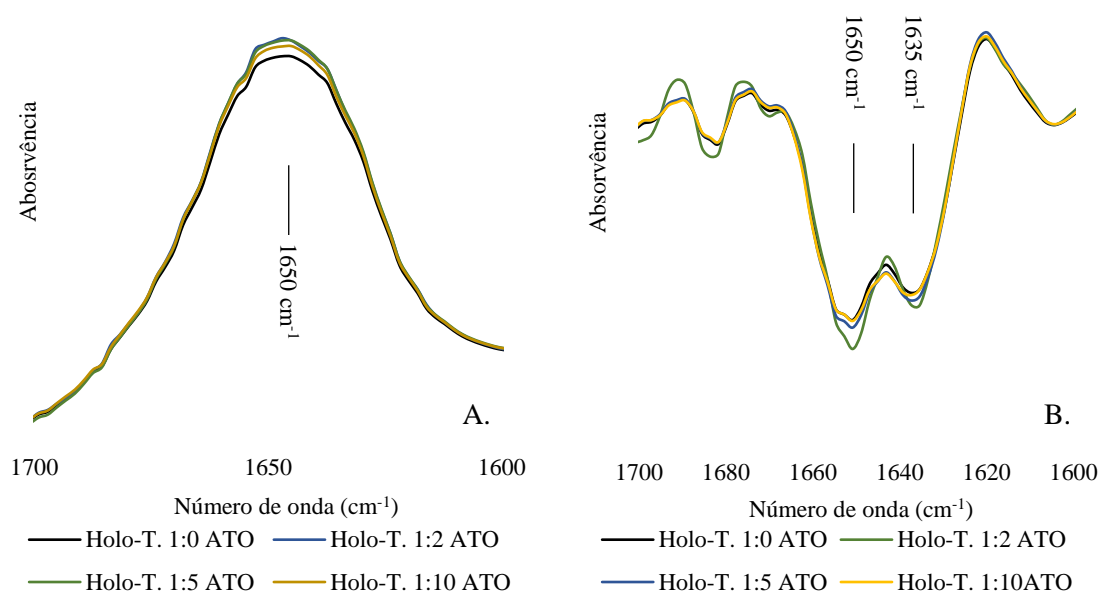


Figura 4.19 Espectros de FT-IR da Holo-transferrina (Holo-T.) na concentração de 32,00 mg/mL (415,58  $\mu\text{M}$ ), após incubação com as proporções de 1:2; 1:5 e 1:10 de ATO. (A) espectro da Amida I; (B) espectro da segunda derivada da Amida I.

## 4.4 Quantificação de ácido rosmarínico em plantas da família *Lamiaceae*

### 4.4.1 Quantificação em extratos aquosos

O RA é um composto antioxidante e encontra-se naturalmente em plantas usadas na alimentação. Torna-se necessário saber se as concentrações para o qual a quantidade de RA influencia a toxicidade do ATO são realistas relativamente à quantidade que existe nas plantas. A quantificação de RA das plantas foi realizada em extratos vegetais obtidos por decocção de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégãos), comumente usados como especiarias, na alimentação Mediterrânica. Estas espécies pertencem à família das *Lamiaceae*, cujas espécies geralmente possuem uma concentração elevada de RA<sup>62</sup>. Foram realizados extratos aquosos extraídos a quente pois é a forma de extração que mais se aproxima da tradicionalmente, como ‘chá’ ou como especiaria na alimentação.

O RA é um composto fenólico, derivado do ácido cafeico e apresenta três picos de absorção caraterísticos 224 nm, 290 e 330 nm (Figura 4.20). Este último comprimento de onda de absorção é utilizado como referência para quantificação de RA em extratos<sup>104</sup>

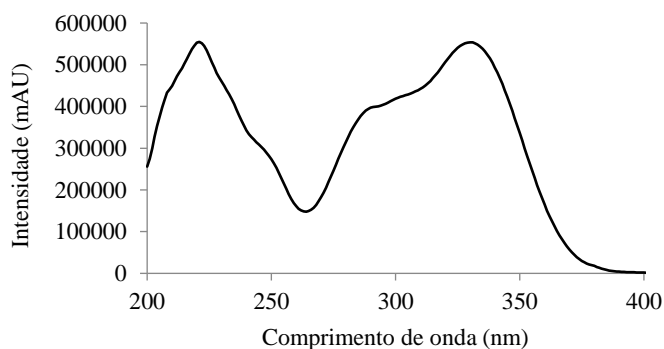


Figura 4.20 Espectro do ácido rosmarínico.

Após as decocções das espécies *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Oreganum vulgare*, obtiveram-se os cromatogramas representados pela Figura 4.21 e dizem respeito a concentrações de 1 mg/mL de extrato liofilizado. O pico de maior intensidade foi observado a 330 nm com um espectro de Uv-visível e tempo de retenção semelhantes ao do RA. Através destes pode-se observar que a espécie *Rosmarinus officinalis* é constituída essencialmente por RA.



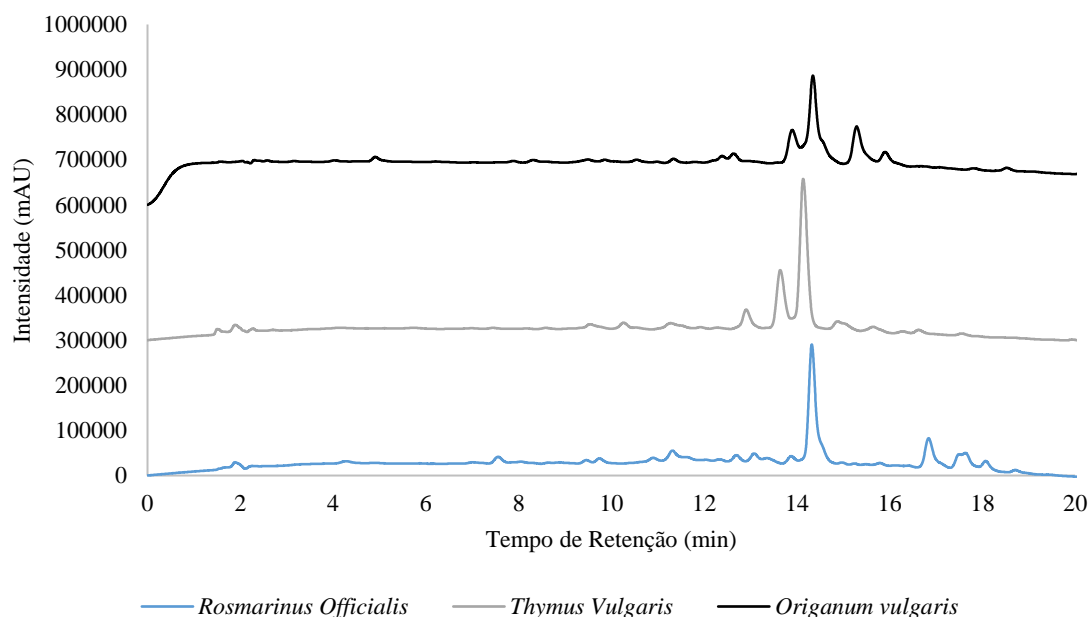


Figura 4.21 Cromatogramas de *Rosmarinus Officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*, obtidos em total-range (200-600 nm) para 1,00mg/mL de extrato vegetal aquoso.

Partindo dos mesmos cromatogramas, lidos a 330 nm e da reta de calibração da Figura 4.22 foi possível quantificar o RA. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7.

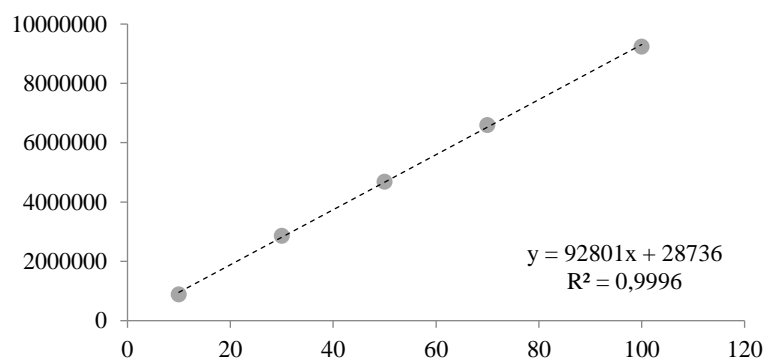


Figura 4.22 Reta de calibração obtida pelas áreas dos picos referentes ao ácido rosmarínico, a 330 nm obtidos entre as concentrações de 10,00 e 100,00 µM.

Tabela 4.7 Concentrações de RA obtidas através da reta representada na Figura 4.22 assim como as concentrações em mg RA/mL obtidos a partir das concentrações em µM e a % de RA/mg de extrato.

Espécies <i>Lamiaceae</i>	Tempo de Retenção (min)	Concentração (µM)	Concentração (mg RA/mL)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	14,32	117,69	0,042
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho)	14,14	35,90	0,013
<i>Origanum vulgare</i> (Orégãos)	14,28	104,99	0,038

Na Tabela 4.7 estão apresentados os tempos de retenção, em minutos, dos picos de intensidade máxima de cada um dos cromatogramas. Quantificou-se uma concentração maior de RA na espécie *Rosmarinus officinalis* com 0,042 RA mg/mL em 1,00 mg/mL de extrato aquoso. Seguidamente a espécie *Origanum vulgare* com 0,038 mg/mL de RA por mg/mL de extrato aquoso. Por fim, a espécie *Thymus vulgaris* foi a que apresentou menor concentração com 0,013 RA mg/mL por cada mg de extrato obtidos.

Tendo em conta os dados da quantificação (Tabela 4.7) e consoante os rendimentos de cada extração calcularam-se as massas totais de RA extraído nos 10,00 gramas de planta. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.7 e observa-se que a espécie *Origanum vulgare* é a que possui maior conteúdo de RA com 87,51 mg de RA nos 10,00 gramas de planta. Seguidamente encontra-se a espécie *Thymus vulgaris* com maior valor de RA por 10,00 gramas de planta e em *Rosmarinus officinalis* observa-se a menor quantidade extraída de RA.

Tabela 4.8 Rendimentos e quantidade de RA total obtido em cada uma das extrações.

Espécies <i>Lamiaceae</i>	Rendimento de extração (%)	Quantidade de RA (mg) extraído de 10 g de planta
<i>Rosmarinus officinalis</i>	6,05%	25,41
<i>Thymus vulgaris</i>	25,91%	33,68
<i>Origanum vulgare</i>	23,03%	87,51

#### 4.4.2 Digestão Gastrointestinal *in vitro*

O trato gastrointestinal é a principal via de entrada de compostos no organismo. Devido às condições em que ocorre a digestão gastrointestinal pode ocorrer hidrólise de moléculas com atividade biológica relevante. Desta forma é então importante mimetizar estas condições de pH e temperatura para criar um ambiente semelhante ao que ocorre nos compartimentos gastrointestinais (estômago e intestino) com o intuito de quantificar que percentagem de composto bioativo é que se encontra disponível para ser absorvido e exercer o seu efeito biológico. A fim de analisar a degradação do RA durante a digestão gastrointestinal prepararam-se duas soluções, uma que mimetiza o efeito do suco gástrico e outra do suco pancreático.

Realizaram-se ensaios de controlo às 0 e às 4 horas para as digestões de cada um dos extratos, estando os cromatogramas obtidos apresentados nos Anexos (7.6 - 7.11). Avaliaram-se os controlos das 0 e das 4 horas como forma de averiguar se houve degradação térmica dos mesmos, uma vez que as amostras controlo foram subtidas a 37°C por 4 horas. Não se verificou perda de composto por degradação térmica. As % de perda de composto foram calculadas pela razão entre as áreas do pico do RA das digestões dos extratos sobre o controlo das 0 horas. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.9. Como se pode observar, as concentrações de RA variam consoante a digestão. Para os três compostos, a digestão gástrica quase não afetou a integridade do RA, sendo que a quantidade disponível para absorção é próxima de 100%, como se observou no trabalho de Dinis et al.<sup>105</sup> A digestão intestinal foi onde se observou maiores perdas de composto, como se pode observar na Tabela 4.9, o que poderá estar associado a reações entre o RA e derivados com grupos tióis livres de enzimas como a  $\alpha$ -amilase assim como cadeias laterais de aminoácidos<sup>106</sup>. Assim, posteriormente ao passo de centrifugação realizado, o RA poder-se-á ter perdido conduzindo à diminuição da concentração

disponível para absorção<sup>106</sup>. Os resultados obtidos encontram-se mais de acordo com o trabalho de Zoric, Z et al.<sup>107</sup> que também observa uma diminuição da estabilidade do RA na digestão intestinal com suco intestinal humano.

Tabela 4.9 Tabela representativa dos resultados obtidos para a digestão gástrica e intestinal. A concentração disponível para absorção por mg RA/ mg de extrato foi obtida por relação direta entre a quantidade de RA por mg de extrato e as percentagens obtidas em cada uma das digestões com os desvios padrão associados (3 replicados).

Espécies de Lamiaceae	Digestão Gástrica (% disponível para absorção)	Concentração disponível para absorção (mg RA/mg extrato liofilizado)	Digestão Pancreática (% disponível para absorção)	Concentração disponível para absorção (mg RA/mg extrato liofilizado)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	98.53 ± 1.47	0,041 ± 6,17E <sup>-4</sup>	82.93 ± 1.81	0,035 ± 7,60E <sup>-4</sup>
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho)	102.69 ± 2.06	0,013 ± 3,47E <sup>-4</sup>	70.27 ± 2.79	9,13E <sup>-3</sup> ± 3,63E <sup>-4</sup>
<i>Origanum vulgare</i> (Orégãos)	105.73 ± 8.85	0,040 ± 3,36E <sup>-4</sup>	72.85 ± 1.29	0,028 ± 4,90E <sup>-4</sup>

Os resultados obtidos sugerem que não se observa hidrólise de RA durante a digestão gástrica. A absorção da maioria dos compostos, como os fenóis, ocorre a nível do intestino delgado. Dessa forma, consideram-se os resultados obtidos da digestão intestinal como as concentrações disponíveis para absorção. Tendo em conta os valores da digestão intestinal e os rendimentos de cada extração, quantificou-se a massa necessária de cada uma das espécies para se obter o efeito biológico verificado nos ensaios de citotoxicidade. Observou-se que serão necessários 94,3 kg de *Rosmarinus officinalis* 88,80kg de *Thymus vulgaris* e 32,50kg de *Origanum vulgare* que correspondem a massas muito superiores às utilizadas em gastronomia. Contudo, o metabolismo de um composto não pode ser avaliado tendo em conta um fator. Desde a absorção até à excreção do composto, há passos de distribuição e metabolização. Estudos de metabolismo do RA *in vivo*, indicam que a administração oral de 200,00mg/mL de RA em ratos demora até 48 horas a ser excretado, detetando-se vários metabolitos resultantes da hidrólise e conjugação com grupos hidrossolúveis (resultantes do metabolismo) do mesmo<sup>108</sup>. Em seres humanos, do sexo masculino, a mesma quantidade (200mg/mL) obtida por administração oral de extratos de *Perilla frutescens* foi administrada em intervalos de 10 dias, determinando-se que o RA é excretado no intervalo de 6 horas<sup>109</sup>. É de notar que nestes estudos apenas se administrou uma dose, sem reincidência ou com um longo período entre tomas, o que não permite concluir qual será o metabolismo do composto por um período de tempo prolongado em concentrações iguais ou inferiores. As espécies analisadas são usadas frequentemente na alimentação mediterrânea e os efeitos do seu consumo a longo prazo não foram ainda investigados. De acordo com os resultados obtidos observa-se que o RA possui um efeito citoprotetor *in vitro*. Estudos *in vivo* poderiam esclarecer a utilidade destas plantas no tratamento dos efeitos nocivos do ATO.



## **5. Conclusão e Perspetivas Futuras**



Em conclusão, a toxicidade de ATO (trióxido de arsénio) em células HeLa na presença de albumina bovina (BSA) é aumentada, sugerindo um papel da BSA no transporte do ATO. A coadministração de ácido rosmarinico (RA), BSA e ATO diminui a citotoxicidade de ATO mesmo em relação a este isolado, o que poderá estar associado ao aumento da estequiometria de ligação BSA-ATO na presença de RA, retendo o composto e impedindo a sua toxicidade. Outros ligandos da BSA têm também a capacidade de modular a ligação de ATO a BSA, nomeadamente quercetina que aumenta a estequiometria de ligação de ATO a BSA, e ácido láurico que diminui. A apo- e a holo-transferrina diminuem a toxicidade de ATO face à linha celular HeLa. Apesar da alteração conformacional da transferrina na presença de  $\text{Fe}^{+3}$ , a capacidade de se associar ao ATO é semelhante em apo- e holo-transferrina. Ambas as proteínas não sofrem alterações revelantes da estrutura secundária e terciária observáveis por FTIR, Uv-Vis e fluorescência após incubação com ATO, sugerindo que a associação do ATO a ambas proteínas de transporte aconteça por interações. As quantidades de material vegetal necessárias para se observar um efeito biológico destoxificante para o ATO, nas mesmas condições que os ensaios de toxicidade, são muito superiores às utilizadas no quotidiano, mesmo para *Origanum vulgare*, a espécie que apresentou maior quantidade de RA extraído por 10,00g de planta. No entanto o efeito da administração de RA em doses frequentes poderá influenciar o efeito citoprotetor observado nos ensaios *in vitro*.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a BSA possui um papel importante na citotoxicidade do ATO, contudo algumas questões são levantadas e merecem investigação futura:

- Avaliar se o trióxido de arsénio na presença de proteínas plasmáticas conduzirá à apoptose ou necrose pela realização de ensaios de citotoxicidade, variando os tempos de incubação do composto entre 12, 24 e 32 horas, nas mesmas condições do trabalho experimental realizado. Essas duas vias de morte celular são distintas, sendo a necrose uma morte celular não programada. Por outro lado, a apoptose é uma forma de morte celular programada demorando mais tempo a iniciar-se. Estudos anteriores indicam que o ATO ative a via das caspase-3 que conduz à apoptose, mas nada se pode concluir relativamente ao efeito do composto na presença de proteínas plasmáticas. A técnica de FT-IR também permite distinguir este comportamento celular, podendo apresentar uma alternativa mais esclarecedora sobre este mecanismo de ativação. Este estudo poderia ser aplicado a mais linhas celulares cancerígenas.
- Avaliar a citotoxicidade na presença de compostos fenólicos como o RA, a quercetina e ácido láurico, com o objetivo de avaliar o comportamento celular e distinguir se as várias modificações provocadas pela ligação de ligandos à BSA (que se observou terem capacidade de influenciar a afinidade do complexo BSA-composto orgânico ao ATO) ou se serão as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos responsáveis pela diminuição da citotoxicidade. Adicionalmente poder-se-ia verificar se as condições de stress oxidativo são diminuídas pela presença de catalase ou SOD, à semelhança de estudos anteriores.
- Avaliar alterações na estrutura terciária das proteínas induzidas por ATO calculando as taxas de troca hidrogénio deutério por FT-IR, como informação complementar.
- Conhecer se as interações eletrostáticas superficiais que o ATO estabelece com a BSA apresentam algum padrão regular por estudos de cristalografia de raio X.
- Quantificar as espécies de arsénio existentes no interior de várias linhas celulares quando o composto é administrado na presença de albumina e transferrina, para conhecer de que forma é que as proteínas influenciam a disponibilidade do ATO.

- Realizar estudos de permeabilidade com RA em células Caco-2 de forma a conhecer que percentagem do mesmo é que é absorvido por aplicação direta de extratos vegetais em células HeLa.
- Realizar ensaios *in vivo*, em ratos, para avaliar se o RA tomado diariamente exerce o mesmo efeito destoxicificante que o observado *in vitro*, assim como se procedeu para a quercetina em estudos anteriores.



## **6. Referências Bibliográficas**



- (1) Doull, J. *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*, 6th Editio.; Curtis D. Klaassen, P. D., Ed.; McGraw-Hill, 2001.
- (2) Chen, Z.; Chen, S.-J. Poisoning the Devil. *Cell* **2017**, *168* (4), 556–560.
- (3) Vahidnia, A.; van der Voet, G. B.; de Wolff, F. A. Arsenic Neurotoxicity — A Review. *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26* (10), 823–832.
- (4) Waxman, S. History of the Development of Arsenic Derivatives in Cancer Therapy. *Oncologist* **2001**, *6* (90002), 3–10.
- (5) Arsenic: A Murderous history The king of poisons <http://www.dartmouth.edu/~toxmetal/arsenic/history.html> (accessed Aug 3, 2017).
- (6) Frith, J. Arsenic – the “Poison of Kings” and the “Saviour of Syphilis.” *J. Mil. Veteran's Heal.* **2013**, *21* (4), 11–18.
- (7) Hughes, M. F.; Beck, B. D.; Chen, Y.; Lewis, A. S.; Thomas, D. J. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicol. Sci.* **2011**, *123* (2), 305–332.
- (8) The Toxicity of Trimethylarsine: An Urban Myth. *J. Environ. Monit.* **2005**, *7* (1), 11.
- (9) Brindle, I. D. Vapour-Generation Analytical Chemistry: From Marsh to Multimode Sample-Introduction System. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388* (4), 735–741.
- (10) Nriagu, J. O. *Arsenic in the Environment, Part 1: Cycling and Characterization*; New York City, 1994.
- (11) J., P. F. Historical use of lead arsenate insecticides, resulting soil contamination and implications for soil remediation <http://soils.tfrec.wsu.edu/leadhistory.htm> (accessed Aug 3, 2017).
- (12) Rund, S. A. C. G.; Consultant, S. Arsenic and Arsenic Compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* **1980**, *23*, 39–141.
- (13) U.S. EPA. *Advisory on EPA's Assessments of Carcinogenic Effects of Organic and Inorganic Arsenic: A Report of the U.S. EPA Science Advisory Board*; Washington D.C., 2007.
- (14) U.S. EPA. Amendment to Organic Arsenicals RED; 2009; pp 7–9.
- (15) Aston, K. I. Genetic Susceptibility to Male Infertility: News from Genome-Wide Association Studies. *Andrology* **2014**, *2* (3), 315–321.
- (16) European Medicines Agency. European public assessment report for Trisenox [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000388/WC500042837.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000388/WC500042837.pdf) (accessed Aug 3, 2017).
- (17) Uslu, R.; Sanli, U. A.; Sezgin, C.; Karabulut, B.; Terzioğlu, E.; Omay, S. B.; Goker, E. Arsenic Trioxide-Mediated Cytotoxicity and Apoptosis in Prostate and Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6* (12), 4957–4964.
- (18) Ma, Z.-B. Arsenic Trioxide Induces Apoptosis of Human Gastrointestinal Cancer Cells. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (18), 5505.
- (19) Ling, Y.-H. Arsenic Trioxide Produces Polymerization of Microtubules and Mitotic Arrest before Apoptosis in Human Tumor Cell Lines. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62* (3), 529–538.
- (20) Kanzawa, T.; Kondo, Y.; Ito, H.; Kondo, S.; Germano, I. Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer Res.* **2003**, *63* (9), 2103–2108.
- (21) Zhang, T.-C.; Cao, E.-H.; Li, J.-F.; Ma, W.; Qin, J.-F. Induction of Apoptosis and Inhibition of Human Gastric Cancer MGC-803 Cell Growth by Arsenic Trioxide. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35* (8), 1258–1263.
- (22) Mills, G. C.; Alperin, J. B.; Trimmer, K. B. Studies on Variant Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases: G6PD Fort Worth. *Biochem. Med.* **1975**, *13* (3), 264–275.
- (23) Bissen, M.; Frimmel, F. H. Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2003**, *31* (1), 9–18.
- (24) Chowdhury, U. K.; Biswas, B. K.; Chowdhury, T. R.; Samanta, G.; Mandal, B. K.; Basu, G. C.; Chanda, C. R.; Lodh, D.; Saha, K. C.; Mukherjee, S. K.; et al. Groundwater Arsenic Contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108* (5), 393–397.
- (25) O'Day, P. A. Chemistry and Mineralogy of Arsenic. *Elements* **2006**, *2* (2), 77–83.
- (26) Lo-Coco, F.; Avvisati, G.; Vignetti, M.; Thiede, C.; Orlando, S. M.; Iacobelli, S.; Ferrara, F.; Fazi, P.; Cicconi, L.; Di Bona, E.; et al. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369* (2), 111–121.
- (27) Yamauchi, H.; Yamamura, Y. Metabolism and Excretion of Orally Administered Arsenic

- Trioxide in the Hamster. *Toxicology* **1985**, 34 (2), 113–121.
- (28) Washington (DC): National Academies Press (US). Choline. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; Washington, DC, 1998.
  - (29) Preedy, V. R. *Betaine*; Preedy, V. R., Ed.; Food and Nutritional Components in Focus; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2015.
  - (30) Europe, W. R. O. Chapter 15 Arsenic. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Copenhagen, Denmark, 1996; Vol. 30, pp 303–327.
  - (31) Toxicants, R. *European Regulatory Classification Criteria, Hazard Communication Elements*; 2011.
  - (32) Organization, W. H. Arsenic - Fact Sheet <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/> (accessed May 2, 2017).
  - (33) United States Geological Survey (USGS) Minerals Resources Program. Arsenic Trioxide Production by Country (Metric tons) <http://www.indexmundi.com/minerals/?product=arsenic> (accessed Aug 4, 2017).
  - (34) Singh, S. K.; Stern, E. A. Global Arsenic Contamination: Living With the Poison Nectar. *Environ. Sci. Policy Sustain. Dev.* **2017**, 59 (2), 24–28.
  - (35) Hossain, M. F. Arsenic Contamination in Bangladesh—An Overview. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2006**, 113 (1–4), 1–16.
  - (36) Fowler, Bruce A.; Weissberg, J. B. Arsine Poisoning. *Med. Prog.* **1974**, 291 (22), 1971–1974.
  - (37) Fu, H.-L.; Jiang, X.; Rosen, B. P. Metalloid Transport Systems. In *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2010; pp 181–207.
  - (38) Shi, H.; Shi, X.; Liu, K. J. Oxidative Mechanism of Arsenic Toxicity and Carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 255 (1/2), 67–78.
  - (39) Hughes, M. F. Arsenic Toxicity and Potential Mechanisms of Action. *Toxicol. Lett.* **2002**, 133 (1), 1–16.
  - (40) Jiang, G.; Gong, Z.; Li, X.-F.; Cullen, W. R.; Le, X. C. Interaction of Trivalent Arsenicals with Metallothionein †. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16 (7), 873–880.
  - (41) Shen, S.; Li, X.-F.; Cullen, W. R.; Weinfeld, M.; Le, X. C. Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (10), 7769–7792.
  - (42) Rosen, B. P. Biochemistry of Arsenic Detoxification. *FEBS Lett.* **2002**, 529 (1), 86–92.
  - (43) Schaller, F. J.; Gerber, S.; Trachsel, C. Transport and Storage. In *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*; 2008.
  - (44) Bujacz, A. Structures of Bovine, Equine and Leporine Serum Albumin. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, 68 (10), 1278–1289.
  - (45) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. Crystal Structure of Human Serum Albumin Complexed with Fatty Acid Reveals an Asymmetric Distribution of Binding Sites. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (9), 827–835.
  - (46) Różga, M.; Sokołowska, M.; Protas, A. M.; Bal, W. Human Serum Albumin Coordinates Cu(II) at Its N-Terminal Binding Site with 1 pM Affinity. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12 (6), 913–918.
  - (47) Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, 52 (3–4), 174–182.
  - (48) Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life* **2005**, 57 (12), 787–796.
  - (49) Roswell, L. B. *Protein Conformation New Research*; Nova Science: New Yorke Publishers: New York City, 2008.
  - (50) Sułkowska, A. Interaction of Drugs with Bovine and Human Serum Albumin. *J. Mol. Struct.* **2002**, 614 (1–3), 227–232.
  - (51) Carter, D. C.; Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45 (C), 153–203.
  - (52) Parker, W.; Song, P. S. Protein Structures in SDS Micelle-Protein Complexes. *Biophys. J.* **1992**, 61 (5), 1435–1439.
  - (53) MacGillivray, R. T. A.; Moore, S. A.; Chen, J.; Anderson, B. F.; Baker, H.; Luo, Y.; Bewley,

- M.; Smith, C. A.; Murphy, M. E. P.; Wang, Y.; et al. Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release †, ‡. *Biochemistry* **1998**, 37 (22), 7919–7928.
- (54) Martin, R. B.; Savory, J.; Brown, S.; Bertholf, R. L.; Wills, M. R. Transferrin Binding of Al<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. *Clin. Chem.* **1987**, 33 (3), 405–407.
- (55) Vincent, J. B.; Love, S. The Binding and Transport of Alternative Metals by Transferrin. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2012**, 1820 (3), 362–378.
- (56) Daniels, T. R.; Delgado, T.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The Transferrin Receptor Part II: Targeted Delivery of Therapeutic Agents into Cancer Cells. *Clin. Immunol.* **2006**, 121 (2), 159–176.
- (57) Li, T. S. C. Part II Herbs and Spices as Functional Ingredients and Flavourings. In *Handbook of herbs and spices*; Parker, K. V., Ed.; Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, 2006; pp 113–125.
- (58) . Y. Z. K.; . S. K. Essential Oils of Lamiaceae Family from South East Mediterranean Region (Turkey). *Pakistan J. Biol. Sci.* **2001**, 4 (10), 1221–1223.
- (59) Füleky, G. *Cultivated Plants, Primarily as Food Sources*; 2009; Vol. II.
- (60) Perumalla, A. V. S.; Hettiarachchy, N. S. Green Tea and Grape Seed Extracts — Potential Applications in Food Safety and Quality. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (4), 827–839.
- (61) Negi, P. S. Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, 156 (1), 7–17.
- (62) Petersen, M. Rosmarinic Acid. *Phytochemistry* **2003**, 62 (2), 121–125.
- (63) Zhu, F.; Asada, T.; Sato, A.; Koi, Y.; Nishiwaki, H.; Tamura, H. Rosmarinic Acid Extract for Antioxidant, Antiallergic, and ??-Glucosidase Inhibitory Activities, Isolated by Supramolecular Technique and Solvent Extraction from Perilla Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (4), 885–892.
- (64) Panizzi, L.; Flamini, G.; Cioni, P. L.; Morelli, I. Composition and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, 39 (3), 167–170.
- (65) Gurib-Fakim, A. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, 27 (1), 1–93.
- (66) Skrt, M.; Benedik, E.; Podlipnik, Č.; Ulrih, N. P. Interactions of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Quenching and Molecular Docking. *Food Chem.* **2012**, 135 (4), 2418–2424.
- (67) Peng, X.; Wang, X.; Qi, W.; Su, R.; He, Z. Affinity of Rosmarinic Acid to Human Serum Albumin and Its Effect on Protein Conformation Stability. *Food Chem.* **2016**, 192, 178–187.
- (68) Nyamah, D.; Obodai Torgbor, J. Colorimetric Method for the Determination of Arsenic in Potable Water. *Water Res.* **1986**, 20 (11), 1341–1344.
- (69) Agrawal, O.; Sunita, G.; Gupta, V. K. A Sensitive Colorimetric Method for the Determination of Arsenic in Environmental and Biological Samples. *J. Chinese Chem. Soc.* **1999**, 46 (4), 641–645.
- (70) Kamaya, M.; Ito, Y.; Otomura, Y.; Ginatullina, E. Comparative Study of Leuco Dyes as Reagents for Spectrophotometric Determination of Arsenic ( III ). **2015**, 3 (1), 22–27.
- (71) Sengupta, B.; Sengupta, P. K. The Interaction of Quercetin with Human Serum Albumin: A Fluorescence Spectroscopic Study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 299 (3), 400–403.
- (72) Shooshtary, S.; Behtash, S.; Nafisi, S. Arsenic Trioxide Binding to Serum Proteins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, 148, 31–36.
- (73) Lehrer, S. Fluorescence and Absorption Studies of the Binding of Copper and Iron to Transferrin. *J. Biol. Chemistry* **1969**, 244 (13), 3613–3617.
- (74) Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2007**, 1767 (9), 1073–1101.
- (75) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- (76) Porfírio, S.; Falé, P. L. V.; Madeira, P. J. A.; Florêncio, M. H.; Ascensão, L.; Serralheiro, M. L. M. Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activities of Plectranthus Barbatus Tea, after in Vitro Gastrointestinal Metabolism. *Food Chem.* **2010**, 122 (1), 179–187.
- (77) Nakagawa, Y.; Akao, Y.; Morikawa, H.; Hirata, I.; Katsu, K.; Naoe, T.; Ohishi, N.; Yagi, K.

- Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis through Oxidative Stress in Cells of Colon Cancer Cell Lines. *Life Sci.* **2002**, 70 (19), 2253–2269.
- (78) Sofia, E.; Brito, C.; Química, M. Atividades Biológicas de Várias Espécies de *Plectranthus* E Influência Sobre a Estrutura de Proteínas, 2016.
  - (79) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30.
  - (80) Wang, T. S.; Kuo, C. F.; Jan, K. Y.; Huang, H. Arsenite Induces Apoptosis in Chinese Hamster Ovary Cells by Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Cell. Physiol.* **1996**, 169 (2), 256–268.
  - (81) Daniels, T. R.; Bernabeu, E.; Rodríguez, J. A.; Patel, S.; Kozman, M.; Chiappetta, D. A.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The Transferrin Receptor and the Targeted Delivery of Therapeutic Agents against Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2012**, 1820 (3), 291–317.
  - (82) Efferth, T.; Benakis, A.; Romero, M. R.; Tomicic, M.; Rauh, R.; Steinbach, D.; Häfer, R.; Stamminger, T.; Oesch, F.; Kaina, B.; et al. Enhancement of Cytotoxicity of Artemisinins toward Cancer Cells by Ferrous Iron. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 37 (7), 998–1009.
  - (83) Singh, N. P.; Lai, H. Selective Toxicity of Dihydroartemisinin and Holotransferrin toward Human Breast Cancer Cells. *Life Sci.* **2001**, 70 (1), 49–56.
  - (84) Nakase, I.; Gallis, B.; Takatani-Nakase, T.; Oh, S.; Lacoste, E.; Singh, N. P.; Goodlett, D. R.; Tanaka, S.; Futaki, S.; Lai, H.; et al. Transferrin Receptor-Dependent Cytotoxicity of Artemisinin–transferrin Conjugates on Prostate Cancer Cells and Induction of Apoptosis. *Cancer Lett.* **2009**, 274 (2), 290–298.
  - (85) Toyama, M.; Yamashita, M.; Hirayama, N.; Murooka, Y. Interactions of Arsenic with Human Metallothionein-2. *J. Biochem.* **2002**, 132 (2), 217–221.
  - (86) Trnkova, L.; Bousova, I.; Kubicek, V.; Drsata, J. Binding of Naturally Occurring Hydroxycinnamic Acids to Bovine Serum Albumin. *Nat. Sci.* **2010**, 2 (6), 563–570.
  - (87) Falé, P. L. V.; Ascenso, L.; Serralheiro, M. L. M.; Haris, P. I. Interaction between *Plectranthus Barbatus* Herbal Tea Components and Human Serum Albumin and Lysozyme: Binding and Activity Studies. *Spectroscopy* **2011**, 26 (2), 79–92.
  - (88) Dufour, C.; Dangles, O. Flavonoid–serum Albumin Complexation: Determination of Binding Constants and Binding Sites by Fluorescence Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2005**, 1721 (1–3), 164–173.
  - (89) Ghosh, A.; Mandal, A. K.; Sarkar, S.; Panda, S.; Das, N. Nanoencapsulation of Quercetin Enhances Its Dietary Efficacy in Combating Arsenic-Induced Oxidative Damage in Liver and Brain of Rats. *Life Sci.* **2009**, 84 (3–4), 75–80.
  - (90) Oguri, T.; Yoshinaga, J.; Toshima, H.; Mizumoto, Y.; Hatakeyama, S.; Tokuoka, S. Urinary Inorganic Arsenic Concentrations and Semen Quality of Male Partners of Subfertile Couples in Tokyo. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **2016**, 51 (6), 463–466.
  - (91) Curry, S.; Brick, P.; Franks, N. P. Fatty Acid Binding to Human Serum Albumin: New Insights from Crystallographic Studies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, 1441 (2–3), 131–140.
  - (92) Choi, J.-K.; Ho, J.; Curry, S.; Qin, D.; Bittman, R.; Hamilton, J. a. Interactions of Very Long-Chain Saturated Fatty Acids with Serum Albumin. *J. Lipid Res.* **2002**, 43 (7), 1000–1010.
  - (93) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Press, Plenum: New York.
  - (94) Hadden, J. et al. Conformational Studies on Human Transferrin. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 20 (1989), 305–308.
  - (95) Pelton, J. T.; McLean, L. R. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Anal. Biochem.* **2000**, 277 (2), 167–176.
  - (96) Wetlaufer, D. B.; Edsall, J. T.; Hollingworth, B. R. Ultraviolet Difference in Proteins Spectra of Tyrosine and Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233 (6), 1421–1428.
  - (97) Antosiewicz, J. M.; Shugar, D. UV–Vis Spectroscopy of Tyrosine Side-Groups in Studies of Protein Structure. Part 1: Basic Principles and Properties of Tyrosine Chromophore. *Biophys. Rev.* **2016**, 8 (2), 151–161.
  - (98) Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Asok Kumar, R.; Castaño, E. M.; Frangione, B. Solubility as Funtion of Proteins Structure and Solvent Components. *Nat. Med.* **1998**, 4 (7), 822–

- (99) Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. Fluorescence Behavior of Tryptophan Residues of Bovine and Human Serum Albumins in Ionic Surfactant Solutions: A Comparative Study of the Two and One Tryptophan(s) of Bovine and Human Albumins. *J. Protein Chem.* **1996**, *15* (3), 265–272.
- (100) Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants: Spectroscopy and Modelling. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, *1594* (1), 84–99.
- (101) Haris, P. I.; Severcan, F. FTIR Spectroscopic Characterization of Protein Structure in Aqueous and Non-Aqueous Media. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **1999**, *7* (1–4), 207–221.
- (102) Neault, J. F.; Arakawa, H.; Malonga, H. The Effect of Aspirin – HSA Complexation on the Protein Secondary Structure. *Can. J. Chem* **2000**, *78* (6), 291–296.
- (103) Bates, G. W.; Schlabach, M. R. The Reaction of Ferric Salts with Transferrin. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (9), 3228–3232.
- (104) Wang, H.; Provan, G. J.; Helliwell, K. Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC. *Food Chem.* **2004**, *87* (2), 307–311.
- (105) Dinis, P. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity After in Vitro Gastrointestinal Digestion of Infusions of Mentha Species. *European J. Med. Plants* **2013**, *3* (3), 381–393.
- (106) Roll, K. Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. **2002**, 3566–3571.
- (107) Zorie, Z. et al. Stability of Rosmarinic Acid in Aqueous Extracts from Different Lamiaceae Species after in Vitro Digestion with Human Gastrointestinal Enzymes. *Food Technol. Biotechnol.* **2016**, *54* (1), 97–102.
- (108) Nakazawa, T.; Ohsawa, K. Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (98), 993–996.
- (109) Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Muto, Y.; Hiyoshi, T.; Takano, H.; Yoshikawa, T.; Terao, J. Absorption, Metabolism, Degradation and Urinary Excretion of Rosmarinic Acid after Intake of Perilla Frutescens Extract in Humans. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44* (1), 1–9.





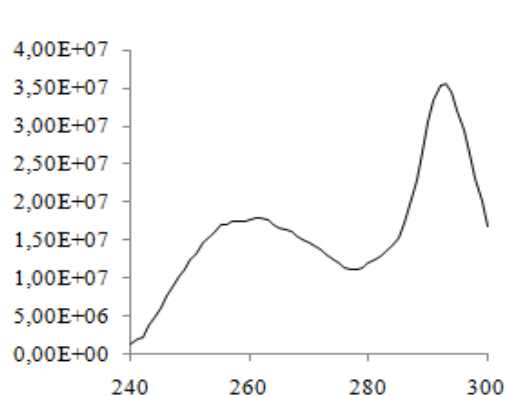
## **7. Anexos**



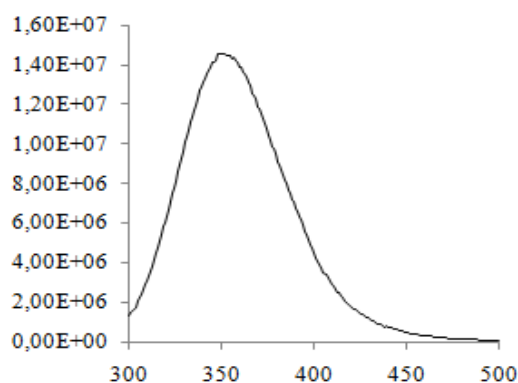
Anexo 7.1 Coeficientes das retas uniparamétricas usadas na calibração, obtidas por regressão linear, assim como o valor do quadrado do coeficiente de correlação entre valores.

Amostra	Declive (m)	Ordenada (b)	R <sup>2</sup>
<b>BSA</b>	0,0044	0,0175	99,68
<b>(BSA-AR) + ATO</b>	0,0132	0,1568	99,01
<b>(BSA-Quercetina) + ATO</b>	0,0085	0,0574	99,2
<b>(BSA+ Ácido láurico) + ATO</b>	0,0185	0,5206	98,44
<b>Apo-Transferrina + ATO</b>	0,0029	0,0184	98,87
<b>Holo-transferrina + ATO</b>	0,0032	0,0579	98,94

Anexo 7.2 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) de BSA (0,40 mg/mL) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respectivamente no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abcissas X).

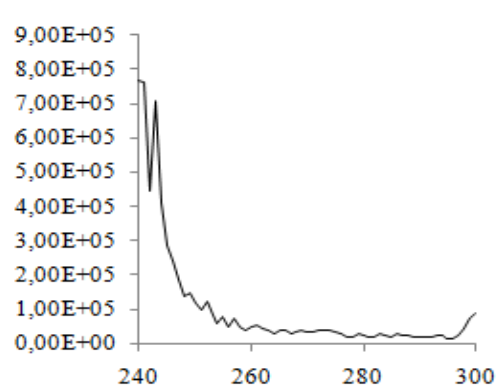


A.

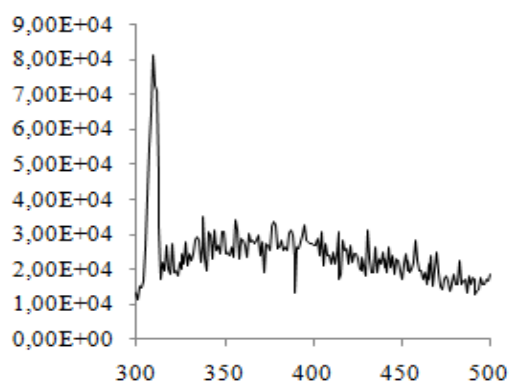


B.

Anexo 7.3 - Espectro de absorção (A) e de emissão (B) do ATO (100,00 µM) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respectivamente no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abcissas X).

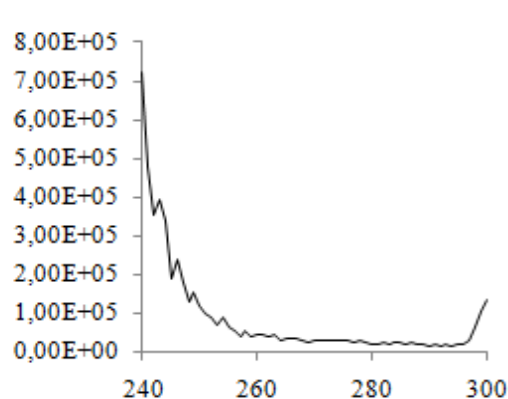


A.

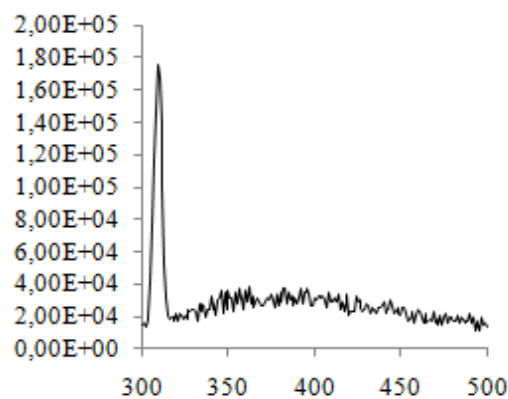


B.

Anexo 7.4 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) do  $\text{Fe}^{3+}$  (100,00  $\mu\text{M}$ ) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respectivamente, no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abscissas X).

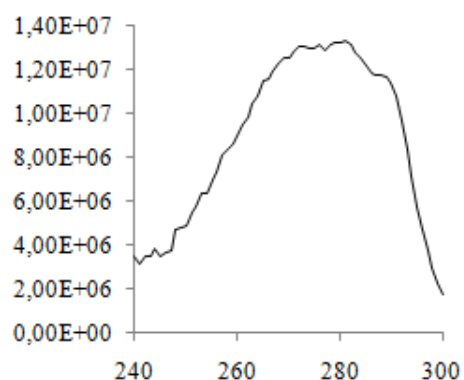


A.

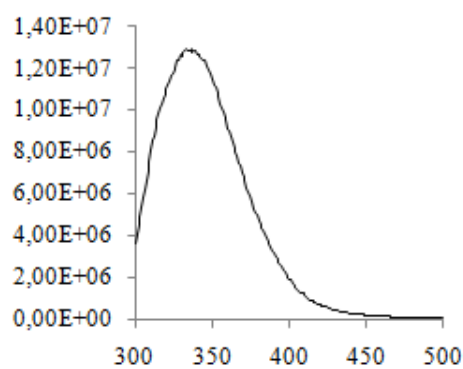


B.

Anexo 7.5 Espectro de absorção (A) e de emissão (B) da apo-transferrina (0,4 mg/mL) tirados com comprimento de onda de excitação de 280 nm. O gráfico está traçado Intensidade de fluorescência (absorção e emissão, respectivamente, no eixo das ordenadas Y) em função do comprimento de onda (eixo das abscissas X).



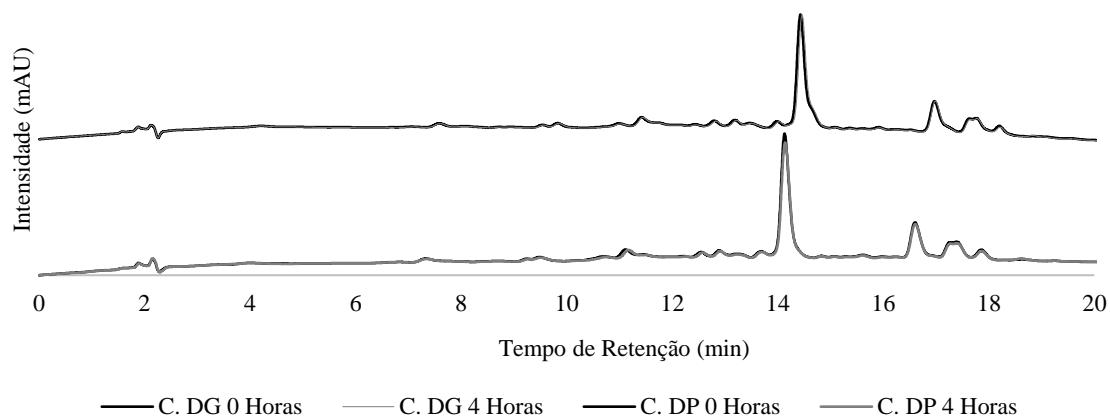
A.



B.

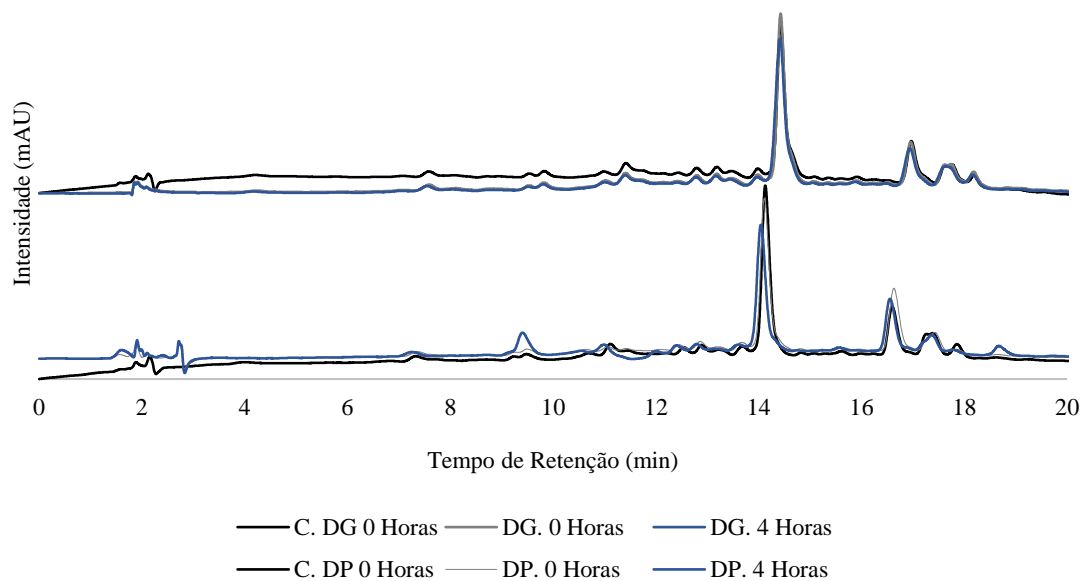
Anexo 7.6 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, *in vitro*, de 1,00m/mL de extrato aquoso obtido de *Rosmarinus Officinalis*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Rosmarinus Officinalis*



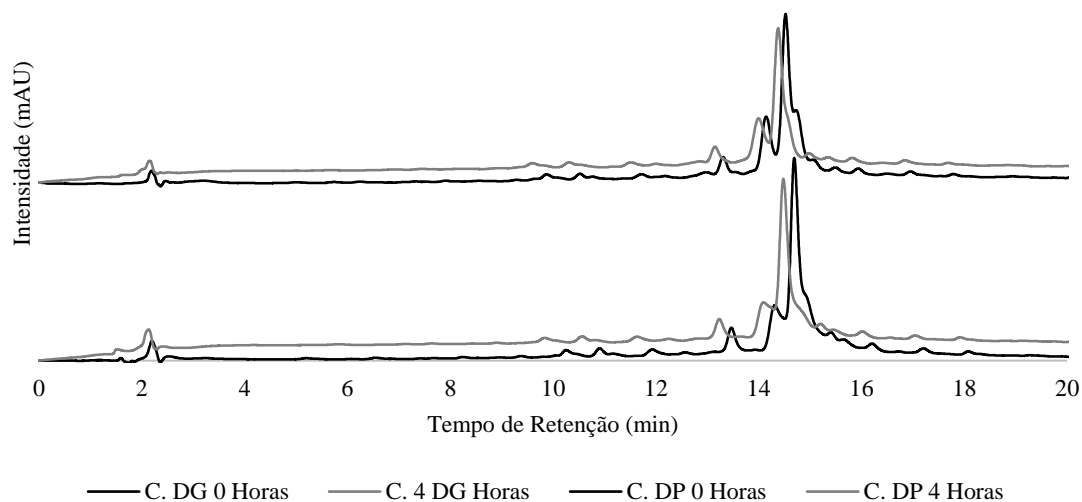
Anexo 7.7 Cromatogramas obtidos após a Digestão Gástrica e Intestinal de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de *Rosmarinus Officinalis* após digestão gastrointestinal *in vitro*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Rosmarinus Officinalis*



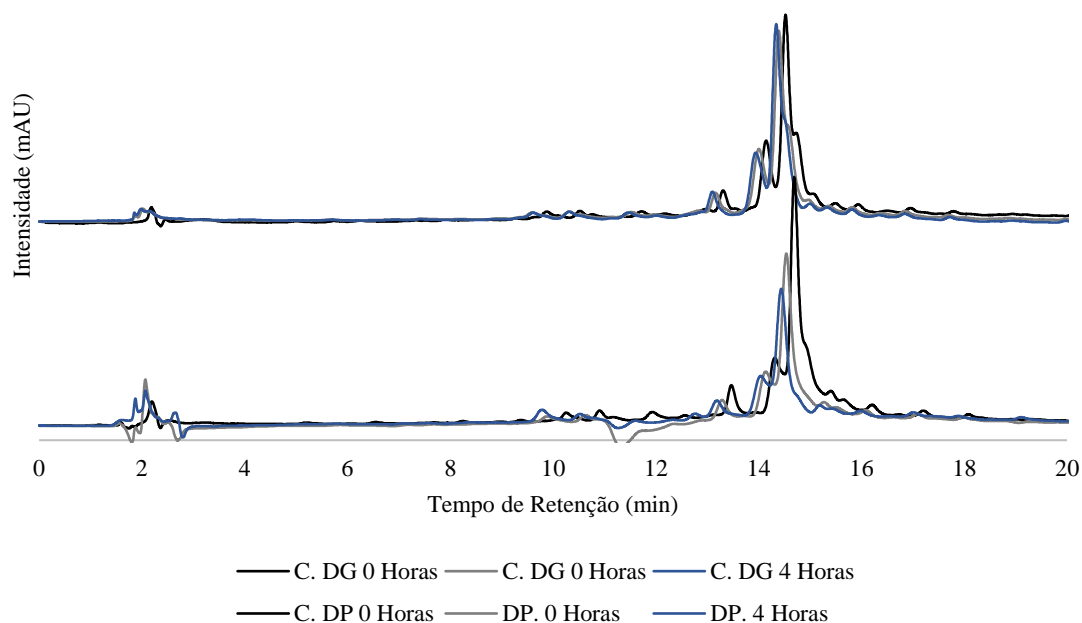
Anexo 7.8 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, *in vitro*, de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de *Thymus vulgaris*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Thymus vulgaris*



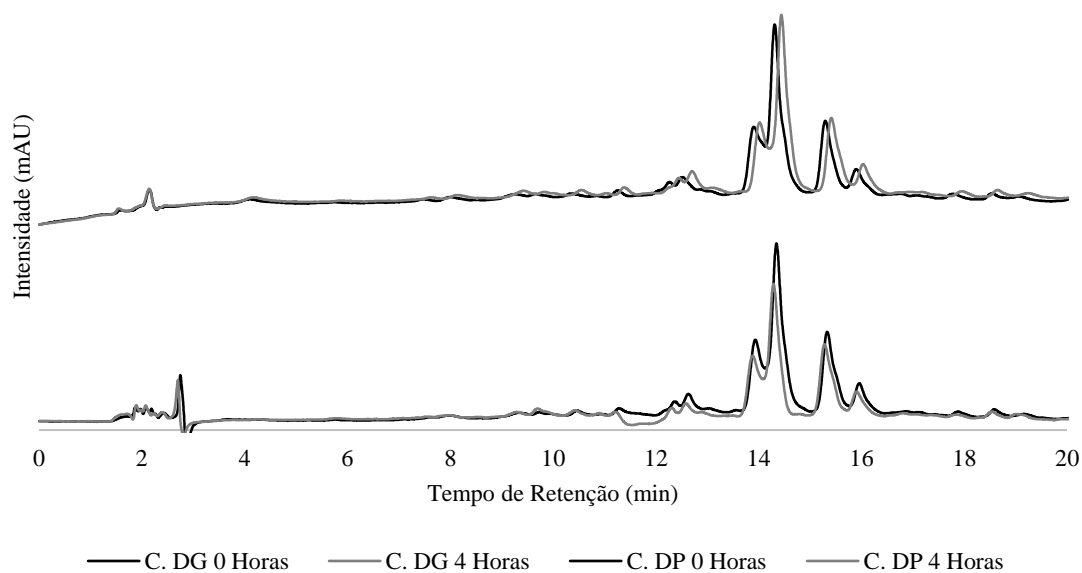
Anexo 7.9 Cromatogramas obtidos após a Digestão Gástrica e Intestinal de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de *Thymus Vulgaris* após digestão gastrointestinal *in vitro*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Thymus vulgaris*



Anexo 7.10 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, *in vitro*, de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de *Origanum vulgare*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Origanum Vulgare*



Anexo 7.11 Cromatogramas obtidos para as amostras de controlo da Digestão Gástrica e Intestinal, *in vitro*, de 1,00 mg/mL de extrato aquoso obtido de *Origanum vulgare*. C.- controlo; DG. Indica os resultados da Digestão Gástrica; DP- Digestão Pancreática

*Origanum Vulgare*

